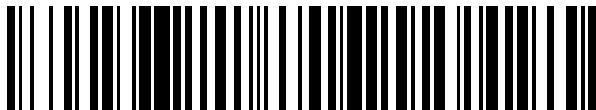


(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS  
ESPAÑA



(11) Número de publicación: **2 933 176**

(51) Int. Cl.:  
**C12Q 1/68**  
(2008.01)

(12)

## TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **15.09.2017 PCT/EP2017/073293**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **22.03.2018 WO18050828**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.09.2017 E 17768768 (8)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.10.2022 EP 3512960**

---

(54) Título: **Procedimientos para realizar PCR ultrarrápida multiplexada**

(30) Prioridad:

**15.09.2016 US 201662395325 P  
16.12.2016 US 201662435595 P  
25.07.2017 US 201762536871 P**

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**02.02.2023**

(73) Titular/es:

**F. HOFFMANN-LA ROCHE AG (100.0%)  
Grenzacherstrasse 124  
4070 Basel, CH**

(72) Inventor/es:

**KOZLOV, IGOR;  
GUPTA, AMAR;  
SAIKI, RANDALL y  
TSAN, ALISON**

(74) Agente/Representante:

**LINAGE GONZÁLEZ, Rafael**

**ES 2 933 176 T3**

---

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

**DESCRIPCIÓN**

Procedimientos para realizar PCR ultrarrápida multiplexada

**5 Campo de la invención**

La presente invención se refiere a procedimientos para la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), en particular a procedimientos para realizar PCR ultrarrápida multiplexada.

**10 Antecedentes de la invención**

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se ha convertido en una herramienta ubicua de investigación biomédica, seguimiento y diagnóstico de enfermedades. La amplificación de secuencias de ácido nucleico por PCR se describe en las patentes de EE. UU. n.<sup>os</sup> 4.683.195, 4.683.202 y 4.965.188. La PCR es ahora bien conocida en la técnica y se ha descrito ampliamente en la literatura científica. Véanse aplicaciones de PCR, ((1999) Innis *et al.*, eds., Academic Press, San Diego), estrategias de PCR, ((1995) Innis *et al.*, eds., Academic Press, San Diego); protocolos de PCR, ((1990) Innis *et al.*, eds., Academic Press, San Diego) y tecnología de PCR, ((1989) Erlich, ed., Stockton Press, New York). Un ensayo de PCR "ultrarrápida" puede amplificar y detectar y cuantificar simultáneamente la cantidad de partida de la secuencia diana. El ensayo de PCR ultrarrápida con TaqMan básico que usa la actividad nucleasa 5' a 3' de la ADN polimerasa se describe en Holland *et al.*, (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. 88:7276-7280 y la patente de EE. UU. n.<sup>o</sup> 5.210.015. La PCR ultrarrápida sin la actividad nucleasa (un ensayo sin nucleasa) se ha descrito en una solicitud de EE. UU. con n.<sup>o</sup> de serie 12/330.694 presentada el 9 de diciembre de 2008. El uso de sondas fluorescentes en la PCR ultrarrápida se describe en la patente de EE. UU. n.<sup>o</sup> 5.538.848.

25 Un protocolo de PCR ultrarrápida típico con sondas fluorescentes implica el uso de una sonda marcada, específica para cada secuencia diana. La sonda se marca preferentemente con uno o más restos fluorescentes, que absorben y emiten luz a longitudes de onda específicas. Tras la hibridación a la secuencia diana o su amplicón, la sonda presenta un cambio detectable en la emisión fluorescente como resultado de la hibridación o hidrólisis de la sonda.

30 Sin embargo, la mayor dificultad del ensayo ultrarrápido sigue siendo la capacidad para analizar numerosas dianas en un tubo individual. En prácticamente todos los campos de la medicina y el diagnóstico, el número de locus de interés se incrementa rápidamente. Por ejemplo, se deben analizar múltiples locus en la elaboración de perfiles de ADN forense, detección de microorganismos patógenos, cribado de enfermedades genéticas de múltiples locus y estudios de expresión de múltiples genes, por nombrar unos pocos.

35 Con la mayoría de los procedimientos actuales, la capacidad para multiplexar un ensayo se limita por los instrumentos de detección. Específicamente, el uso de múltiples sondas en la misma reacción requiere el uso de distintos marcadores fluorescentes. Para detectar simultáneamente múltiples sondas, un instrumento debe poder distinguir entre las señales lumínicas emitidas por cada sonda. La mayoría de las tecnologías actuales en el mercado no permiten la detección de más de cuatro a siete longitudes de onda separadas en el mismo recipiente de reacción. Por lo tanto, usando una sonda marcada de forma única por diana, no se pueden detectar más de cuatro a siete dianas separadas en el mismo recipiente. En la práctica, al menos una diana es normalmente un ácido nucleico de control. En consecuencia, en la práctica, se pueden detectar no más de tres a seis dianas experimentales en el mismo tubo. El uso de tintes fluorescentes también se limita debido al ancho espectral donde solo se pueden ajustar aproximadamente seis o siete tintes dentro del espectro visible sin una interferencia de superposición significativa. Por tanto, la capacidad para multiplexar un ensayo no seguirá el ritmo de las necesidades clínicas, a menos que se realicen cambios radicales en la estrategia de amplificación y detección.

50 Se proporciona una capacidad adicional para multiplexar una reacción de amplificación ultrarrápida por un ensayo de fusión posterior a la PCR. Véase la solicitud de patente de EE. UU. con número de serie 11/474.071, presentada el 23 de junio de 2006. En un ensayo de fusión, el ácido nucleico amplificado se identifica por su perfil de fusión único. Un ensayo de fusión implica determinar la temperatura de fusión (punto de fusión) de una diana bicatenaria, o un dúplex entre la sonda marcada y la diana. Como se describe en la patente de EE. UU. n.<sup>o</sup> 5.871.908, para determinar la temperatura de fusión usando una sonda marcada de forma fluorescente, se calienta (o se enfria) gradualmente un dúplex entre el ácido nucleico diana y la sonda en un programa de temperatura controlada. La disociación del dúplex cambia la distancia entre fluoróforos que interactúan o entre fluoróforo y extintor. Los fluoróforos que interactúan se pueden conjugar para separar moléculas de sonda, como se describe en la patente de EE. UU. n.<sup>o</sup> 6.174.670. De forma alternativa, un fluoróforo se puede conjugar a una sonda, mientras que el otro fluoróforo se puede intercalar en un dúplex de ácido nucleico, como se describe en la patente de EE. UU. n.<sup>o</sup> 5.871.908. Aún como otra alternativa, los fluoróforos se pueden conjugar con un oligonucleótido de sonda individual. Tras la fusión del dúplex, la fluorescencia se extingue a medida que el fluoróforo y el extintor se unen en la sonda ahora monocatenaria.

65 La fusión del dúplex de ácido nucleico se sigue midiendo el cambio asociado en la fluorescencia. El cambio en la fluorescencia se puede representar en un gráfico denominado "perfil de fusión". Debido a que se pueden diseñar diferentes dúplex sonda-diana para fundirse (o rehíbridarse) a diferentes temperaturas, cada sonda generará un

perfil de fusión único. Las sondas diseñadas apropiadamente tendrían temperaturas de fusión que se pueden distinguir claramente de las de las otras sondas en el mismo ensayo. Muchas herramientas informáticas existentes posibilitan diseñar sondas para un ensayo múltiple en el mismo tubo con estos objetivos en mente. Por ejemplo, el programa informático Visual OMP™ (DNA Software, Inc., Ann Arbor, Michigan) posibilita determinar las temperaturas de fusión de los dúplex de ácido nucleico en diversas condiciones de reacción.

El procedimiento de PCR múltiple usando detección de color y posterior ensayo de fusión posterior a la amplificación se describe en la patente de EE. UU. n.º 6.472.156. El número de dianas detectables por un procedimiento de este tipo es un producto del número de longitudes de onda detectables y el número de perfiles de fusión distinguibles. Por lo tanto, añadir un ensayo de fusión a la detección de color fue un paso adelante en la capacidad para detectar múltiples dianas.

El ensayo de fusión posterior a la amplificación se usa más comúnmente con propósitos cualitativos, es decir, para identificar ácidos nucleicos diana, véanse las patentes de EE. UU. n.os 6.174.670, 6.427.156 y 5.871.908. Es conocido cómo obtener un pico de fusión diferenciando la función de la curva de fusión. Ririe *et al.* ("Product differentiation by analysis of DNA melting curves during the polymerase chain reaction", (1997) *Anal. Biochem.* 245:154-160) observó que la diferenciación ayuda a resolver las curvas de fusión generadas por mezclas de productos. Después de la diferenciación, los picos de fusión generados por cada componente de la mezcla se vuelven fácilmente distinguibles. También era conocido previamente que la señal de fusión posterior a la amplificación, es decir, el pico de fusión, es mayor en proporción a la cantidad de ácido nucleico en la muestra. Por ejemplo, la patente de EE. UU. n.º 6.245.514 enseña un ensayo de fusión posterior a la amplificación usando un tinte de intercalación de dúplex, para generar un pico de fusión derivado, y a continuación, usando un programa informático patentado, para integrar el pico. La integración proporciona información sobre la eficacia de la amplificación y la cantidad relativa del ácido nucleico amplificado.

En la práctica, sería deseable ir más allá de un ensayo cualitativo y poder cuantificar múltiples dianas en la misma muestra. Véase, por ejemplo, Sparano *et al.* "Development of the 21-gene assay and its application in clinical practice and clinical trials", *J. Clin. Oncol.* (2008) 26(5):721-728. La capacidad para cuantificar la cantidad de diana es útil en aplicaciones clínicas, tales como la determinación de la carga vírica en el suero de un paciente, la medición del nivel de expresión de un gen en respuesta al tratamiento farmacológico o la determinación del distintivo molecular de un tumor para predecir su respuesta al tratamiento. El documento WO 2010/013017 divulga una PCR ultrarrápida múltiple para analizar múltiples locus de una secuencia de ácido nucleico diana en un recipiente individual usando conjuntos de sondas que se hibridan a diferentes locus genéticos y que tienen diferentes temperaturas de fusión. En presencia de una secuencia diana, se consume la sonda correspondiente. El análisis cualitativo y cuantitativo de las secuencias diana presentes en la muestra se realiza por análisis del perfil de fusión de las sondas restantes y la comparación con el perfil de fusión de las sondas antes de la reacción.

En un ensayo de PCR ultrarrápida, la señal generada por la sonda marcada se puede usar para estimar la cantidad de ácido nucleico diana de aporte. Cuanto mayor sea el aporte, antes cruzará la señal de fluorescencia un valor de umbral predeterminado ( $C_t$ ). Por lo tanto, se pueden determinar las cantidades relativas o absolutas del ácido nucleico diana comparando las muestras entre sí o con una muestra de control con una cantidad conocida de ácido nucleico. Sin embargo, los procedimientos existentes están limitados en su capacidad para cuantificar simultáneamente múltiples dianas. Al igual que con la detección cualitativa de múltiples dianas, el factor limitante es la disponibilidad de fluoróforos espectralmente resolubles. Como se expuso anteriormente, la tecnología de marcadores fluorescentes de última generación no puede obtener señales distintas de más de seis o siete sondas marcadas de forma fluorescente separadas en el mismo tubo. Por lo tanto, se necesita un enfoque experimental radicalmente diferente para permitir la amplificación y detección de numerosas dianas de ácido nucleico durante la PCR ultrarrápida.

Son conocidos muchos procedimientos para la detección de ácidos nucleicos diana. Los ensayos homogéneos actualmente disponibles para la detección de ácidos nucleicos incluyen los ensayos con cebadores TaqMan®, Ampliflour®, unión de tintes, PCR cinética selectiva de alelo y Scorpion®. Estos procedimientos de ensayo no se multiplexan fácilmente debido al requisito de detectar un tinte diferente para cada ácido nucleico diana, y por tanto están limitados en su potencial de mejora. Para superar dichas limitaciones, varios estudios recientes han divulgado el uso de sondas oligonucleotídicas que contienen una porción de "marca" escindible que se puede separar y detectar fácilmente (por ejemplo, véanse Chenna *et al.*, publicación de solicitud de patente de EE. UU. n.º 2005/0053939, Van Den Boom, patente de EE. UU. n.º 8.133.701). Más recientemente, se han descrito procedimientos mejorados para realizar la identificación de diana de ácido nucleico multiplexada usando escisión de sonda oligonucleotídica basada en estructura en la publicación de solicitud de patente de EE. UU. 2014/0272955, documentos U.S. 2015/0176075 y U.S. 2015/0376681. Otros procedimientos para detectar la secuencia de ácido nucleico diana a partir de ADN o una mezcla de ácido nucleico por el uso de una combinación de "oligonucleótido de sondeo y marcaje" (PTO) y "oligonucleótido de captura y moldeo" (CTO) en un denominado ensayo de escisión y extensión con PTO se han descrito por Chun *et al.* en la patente de EE. UU. n.º 8.809.239. Además, el documento WO 2016/101959 divulga una sonda oligonucleotídica que se compone de una porción de hibridación diana marcada con un par de fluoróforo/extintor de interacción y una porción de marca que no es complementaria a la secuencia diana, en la que la porción de marca se compone de un "oligonucleótido de sondeo

5 y marcaje" (PTO) y una "región decisiva de temperatura de fusión" (MTDR). Un "oligonucleótido de captura y extinción" (CQO) que comprende un segundo extintor se hibrida con la MTDR. Tras la hibridación a la secuencia diana, se libera un "fragmento dúplex de marca activado" que consiste en la MTDR que todavía porta el fluoróforo y el CQO en una reacción de escisión, que en una reacción de detección posterior indica la presencia de una secuencia diana.

Sin embargo, todavía existe la necesidad de un procedimiento exacto para realizar una detección múltiple de alto rendimiento de ácidos nucleicos diana.

## 10 Sumario de la invención

15 La presente invención proporciona procedimientos novedosos para la detección de secuencias de ácidos nucleicos, en particular la detección de múltiples ácidos nucleicos diana usando un ensayo de PCR ultrarrápida. Los procedimientos se realizan por el uso de sondas oligonucleotídicas novedosas que tienen dos rasgos 20 característicos únicos, una porción de marca no complementaria y una molécula de extinción.

El alcance de la invención se describe en las reivindicaciones adjuntas.

25 Por lo tanto, en un aspecto, la invención proporciona un procedimiento para amplificación y detección de un ácido nucleico diana en una muestra que comprende las etapas de: (a) poner en contacto la muestra que contiene el ácido nucleico diana en un recipiente de reacción individual con (i) un par de cebadores oligonucleotídicos, pudiendo cada cebador oligonucleotídico hibridarse a hebras opuestas de una subsecuencia del ácido nucleico diana; (ii) una sonda oligonucleotídica que comprende una porción de hibridación y una porción de marca, en la que la porción de marca comprende una secuencia de nucleótidos no complementaria a la secuencia de ácido nucleico diana o una molécula no nucleotídica, en la que la porción de hibridación comprende una secuencia de nucleótidos al menos parcialmente complementaria a la secuencia de ácido nucleico diana y se hibrida a una región de la subsecuencia del ácido nucleico diana que está unida por el par de cebadores oligonucleotídicos, en el que la sonda comprende además un marcador doble interactivo que comprende un resto indicador localizado en la porción de marca o en la porción de hibridación y un primer resto extintor localizado en la porción de hibridación y en el que el resto indicador está separado del primer resto extintor por un sitio de escisión susceptible a nucleasa; y en el que la porción de marca se une de forma reversible de manera dependiente de la temperatura a un oligonucleótido de extinción que comprende o está asociado con uno o más restos extintores que pueden extinguir el resto indicador cuando el oligonucleótido de extinción se une a la porción de marca; (b) amplificar el ácido nucleico diana por PCR usando una ácido nucleico polimerasa que tiene actividad nucleasa 5' a 3' de modo que durante una etapa de extensión de cada ciclo de PCR, la actividad nucleasa de la polimerasa permite la escisión y la separación del resto indicador del primer resto extintor en la porción de hibridación de la sonda; (c) medir una señal suprimida del resto indicador a una primera temperatura a la que el oligonucleótido de extinción se une a la porción de marca; (d) incrementar la temperatura hasta una segunda temperatura a la que el oligonucleótido de extinción no se une a la porción de marca; (e) medir una señal corregida por temperatura del resto indicador a la segunda temperatura; (f) obtener un valor de señal calculado restando la señal suprimida detectada a la primera temperatura de la señal corregida por temperatura detectada a la segunda temperatura; (g) repetir las etapas de (b) a (f) a través de múltiples ciclos de PCR; (h) medir los valores de señal calculados de los múltiples ciclos de PCR para detectar la presencia del ácido nucleico diana.

30 40 45 50 55 60 En un modo de realización, la porción de marca comprende una modificación de modo que no se puede extender por una ácido nucleico polimerasa. En un modo de realización, el resto indicador está en la porción de marca de la sonda oligonucleotídica. En otro modo de realización, el resto indicador está localizado en la porción de hibridación de la sonda oligonucleotídica y puede interactuar de manera dependiente de la temperatura con el oligonucleótido de extinción que comprende el segundo resto extintor. En un modo de realización, la porción de marca comprende una secuencia de nucleótidos no complementaria a la secuencia de ácido nucleico diana y el oligonucleótido de extinción es un oligonucleótido que comprende una secuencia de nucleótidos al menos parcialmente complementaria a la porción de marca de la sonda oligonucleotídica y se une a la porción de marca por hibridación. En otro modo de realización, la porción de marca de la sonda oligonucleotídica o el oligonucleótido de extinción o tanto la porción de marca como el oligonucleótido de extinción contienen una o más modificaciones de nucleótidos. Aún en otro modo de realización, la una o más modificaciones de nucleótidos se selecciona del grupo que consiste en ácido nucleico bloqueado (LNA), ácido peptidonucleico (PNA), ácido nucleico con puente (BNA), sustitución de 2'-O-alquilo, nucleótido L-enantiomérico o combinaciones de los mismos. En un modo de realización, el resto indicador es un tinte fluorescente y el resto extintor extingue una señal detectable del tinte fluorescente.

65 En otro aspecto, la invención proporciona un procedimiento para detectar dos o más secuencias de ácido nucleico diana en una muestra que comprende las etapas de: (a) poner en contacto la muestra que se sospecha que contiene las dos o más secuencias de ácido nucleico diana en un recipiente de reacción individual con (i) un primer par de cebadores oligonucleotídicos con secuencias de nucleótidos que son complementarias a cada hebra de una primera secuencia de ácido nucleico diana, y un segundo par de cebadores oligonucleotídicos con secuencias de nucleótidos que son complementarias a cada hebra de una segunda secuencia de ácido nucleico diana; (ii) una

primera sonda oligonucleotídica que comprende una secuencia de nucleótidos al menos parcialmente complementaria a la primera secuencia de ácido nucleico diana y que se hibrida dentro de una región de la primera secuencia de ácido nucleico diana unida por el primer par de cebadores oligonucleotídicos, en el que la primera sonda oligonucleotídica comprende un resto fluorescente que puede generar una señal detectable y un primer resto extintor que puede extinguir la señal detectable generada por el resto fluorescente, en el que el resto fluorescente está separado del primer resto extintor por un sitio de escisión susceptible a nucleasa; (iii) una segunda sonda oligonucleotídica que comprende dos porciones distintas, una porción de hibridación que comprende una secuencia de nucleótidos al menos parcialmente complementaria a la segunda secuencia de ácido nucleico diana y que se hibrida dentro de una región de la segunda secuencia de ácido nucleico diana unida por el segundo par de cebadores oligonucleotídicos, en la que la porción de hibridación comprende un segundo resto extintor; y una porción de marca fijada al extremo 5' o al extremo 3' de la porción de hibridación o fijada por medio de un conector a una región de la porción de hibridación que comprende una secuencia de nucleótidos que no es complementaria a las dos o más secuencias de ácido nucleico diana, en la que la porción de marca comprende un resto fluorescente que es idéntico al resto fluorescente en la primera sonda oligonucleotídica y con una señal detectable que se puede extinguir por el segundo resto extintor en la porción de hibridación, en la que el resto fluorescente está separado del segundo resto extintor por un sitio de escisión susceptible a nucleasa; (iv) un oligonucleótido de extinción que comprende una secuencia de nucleótidos al menos parcialmente complementaria a la porción de marca de la segunda sonda oligonucleotídica y que se hibrida a la porción de marca para formar un dúplex, en el que el oligonucleótido de extinción comprende un tercer resto extintor que extingue la señal detectable generada por el resto fluorescente en la porción de marca cuando el oligonucleótido de extinción se hibrida a la porción de marca; (b) amplificar las primera y segunda secuencias de ácido nucleico diana por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) usando una ácido nucleico polimerasa que tiene actividad nucleasa 5' a 3' de modo que durante una etapa de extensión de cada ciclo de PCR, la actividad nucleasa 5' a 3' de la ácido nucleico polimerasa permite la escisión y la separación del resto fluorescente del primer resto extintor en la primera sonda oligonucleotídica, y la escisión y la separación del resto fluorescente en la porción de marca del segundo resto extintor en la porción de hibridación de la segunda sonda oligonucleotídica, en el que en la etapa de extensión el oligonucleótido de extinción permanece hibridado a la porción de marca; (c) medir una señal fluorescente a una primera temperatura a la que se hibrida el oligonucleótido de extinción a la porción de marca de la segunda sonda oligonucleotídica; (d) incrementar la temperatura hasta una segunda temperatura, que es mayor que la primera temperatura, a la que el oligonucleótido de extinción no se hibrida a la porción de marca de la segunda sonda oligonucleotídica; (e) medir una señal fluorescente a la segunda temperatura; (f) obtener un valor de señal calculado restando la señal fluorescente detectada a la primera temperatura de la señal fluorescente detectada a la segunda temperatura; (g) repetir las etapas de (b) a (f) en múltiples ciclos de PCR para producir la cantidad deseada de productos de amplificación de las primera y segunda secuencias de ácido nucleico diana; (h) determinar la presencia de la primera secuencia de ácido nucleico diana a partir de las señales fluorescentes detectadas a la primera temperatura de los múltiples ciclos de PCR y la presencia de la segunda secuencia de ácido nucleico diana a partir de los valores de señal calculados de los múltiples ciclos de PCR.

En un modo de realización, la porción de marca comprende una modificación de modo que no se puede extender por una ácido nucleico polimerasa. En otro modo de realización, la porción de marca se fija al extremo 5' de la porción de hibridación. Aún en otro modo de realización, la porción de marca se fija al extremo 3' de la porción de hibridación. Aún en otro modo de realización, la porción de marca se fija por medio de un conector a una región de la porción de hibridación. En otro modo de realización, la porción de marca de la segunda sonda oligonucleotídica o el oligonucleótido de extinción o tanto la porción de marca como el oligonucleótido de extinción contienen una o más modificaciones de nucleótidos. Aún en otro modo de realización, la una o más modificaciones de nucleótidos se selecciona del grupo que consiste en ácido nucleico bloqueado (LNA), ácido peptidónucleico (PNA), ácido nucleico con puente (BNA), sustitución de 2'-O-alquilo, nucleótido L-enantiomérico o combinaciones de los mismos.

Aún en otro aspecto, la invención proporciona un procedimiento para detectar dos o más secuencias de ácido nucleico diana en una muestra que comprende las etapas de: (a) poner en contacto la muestra que se sospecha que contiene las dos o más secuencias de ácido nucleico diana en un recipiente de reacción individual con (i) un primer par de cebadores oligonucleotídicos con secuencias que son complementarias a cada hebra de una primera secuencia de ácido nucleico diana, y un segundo par de cebadores oligonucleotídicos con secuencias que son complementarias a cada hebra de una segunda secuencia de ácido nucleico diana; (ii) una primera sonda oligonucleotídica que comprende dos porciones distintas, una primera porción de hibridación que comprende una secuencia al menos parcialmente complementaria a la primera secuencia de ácido nucleico diana y que se hibrida dentro de una región de la primera secuencia de ácido nucleico diana unida por el primer par de cebadores oligonucleotídicos, en la que la primera porción de hibridación comprende un primer resto extintor; y una primera porción de marca fijada al extremo 5' o al extremo 3' de la primera porción de hibridación o fijada por medio de un conector a una región de la primera porción de hibridación que comprende una secuencia de nucleótidos que no es complementaria a las dos o más secuencias de ácido nucleico diana, en la que la primera porción de marca comprende un resto fluorescente con una señal detectable que se puede extinguir por el primer resto extintor en la primera porción de hibridación, en la que el resto fluorescente está separado del primer resto extintor por un sitio de escisión susceptible a nucleasa; (iii) un primer oligonucleótido de extinción que comprende una secuencia al menos parcialmente complementaria a la primera porción de marca de la primera sonda oligonucleotídica y que se hibrida a la primera porción de marca para formar un dúplex, en el que el primer oligonucleótido de extinción

- comprende un segundo resto extintor que extingue la señal detectable generada por el resto fluorescente en la primera porción de marca cuando el primer oligonucleótido de extinción se hibrida a la primera porción de marca; (iv) una segunda sonda oligonucleotídica que comprende dos porciones distintas, una segunda porción de hibridación que comprende una secuencia al menos parcialmente complementaria a la segunda secuencia de ácido nucleico diana y que se hibrida dentro de una región de la segunda secuencia de ácido nucleico diana unida por el segundo par de cebadores oligonucleotídicos, en la que la segunda porción de hibridación comprende un tercero resto extintor; y una segunda porción de marca fijada al extremo 5' o al extremo 3' de la segunda porción de hibridación o fijada por medio de un conector a una región de la segunda porción de hibridación que comprende una secuencia de nucleótidos que no es complementaria a las dos o más secuencias de ácido nucleico diana y que tiene una secuencia nucleica diferente o modificaciones de nucleótidos diferentes en comparación con la secuencia de nucleótidos de la primera porción de marca de la primera sonda oligonucleotídica, en la que la segunda porción de marca comprende un resto fluorescente que es idéntico al resto fluorescente en la primera porción de marca de la primera sonda oligonucleotídica y con una señal detectable que se puede extinguir por el tercero resto extintor en la segunda porción de hibridación, en la que el resto fluorescente está separado del tercero resto extintor por un sitio de escisión susceptible a nucleasa; (v) un segundo oligonucleótido de extinción que comprende una secuencia al menos parcialmente complementaria a la segunda porción de marca de la segunda sonda oligonucleotídica y que se hibrida a la segunda porción de marca para formar un dúplex, en el que el segundo oligonucleótido de extinción comprende un cuarto resto extintor que extingue la señal detectable generada por el resto fluorescente en la segunda porción de marca cuando el segundo oligonucleótido de extinción se hibrida a la segunda porción de marca; en el que el dúplex entre el segundo oligonucleótido de extinción y la segunda porción de marca de la segunda sonda oligonucleotídica tiene un valor de temperatura de fusión (T<sub>f</sub>) mayor que el dúplex entre el primer oligonucleótido de extinción y la primera porción de marca de la primera sonda oligonucleotídica; (b) amplificar las primera y segunda secuencias de ácido nucleico diana por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) usando una ácido nucleico polimerasa que tiene actividad nucleasa 5' a 3' de modo que durante una etapa de extensión de cada ciclo de PCR, la actividad nucleasa 5' a 3' de la ácido nucleico polimerasa permite (i) la escisión y la separación del resto fluorescente en la primera porción de marca del primer resto extintor en la primera porción de hibridación de la primera sonda oligonucleotídica, en el que en la etapa de extensión el primer oligonucleótido de extinción permanece hibridado a la primera porción de marca, y (ii) la escisión y la separación del resto fluorescente en la segunda porción de marca del tercer resto extintor en la segunda porción de hibridación de la segunda sonda oligonucleotídica, en el que en la etapa de extensión el segundo oligonucleótido de extinción permanece hibridado a la segunda porción de marca; (c) incrementar la temperatura hasta una primera temperatura a la que el primer oligonucleótido de extinción no se hibrida a la primera porción de marca de la primera sonda oligonucleotídica y el segundo oligonucleótido de extinción permanece hibridado a la segunda porción de marca de la segunda sonda oligonucleotídica; (d) medir una señal fluorescente a la primera temperatura; (e) incrementar la temperatura hasta una segunda temperatura a la que el segundo oligonucleótido de extinción no se hibrida a la segunda porción de marca de la segunda sonda oligonucleotídica; (f) medir una señal fluorescente a la segunda temperatura; (g) obtener un valor de señal calculado restando la señal fluorescente detectada a la primera temperatura de la señal fluorescente detectada a la segunda temperatura; (h) repetir las etapas de (b) a (g) en múltiples ciclos de PCR para producir la cantidad deseada de productos de amplificación de las primera y segunda secuencias de ácido nucleico diana; (l) determinar la presencia de la primera secuencia de ácido nucleico diana a partir de las señales fluorescentes detectadas a la primera temperatura de los múltiples ciclos de PCR y la presencia de la segunda secuencia de ácido nucleico diana a partir de los valores de señal calculados de los múltiples ciclos de PCR.
- 45 En un modo de realización, la primera porción de marca y la segunda porción de marca comprenden ambas una modificación de modo que ambas porciones de marca no se pueden extender por una ácido nucleico polimerasa.
- En un modo de realización, la primera porción de marca se fija al extremo 3' de la primera porción de hibridación de la primera sonda oligonucleotídica y la segunda porción de marca se fija al extremo 3' de la segunda porción de hibridación de la segunda sonda oligonucleotídica. En otro modo de realización, la primera porción de marca se fija al extremo 3' de la primera porción de hibridación de la primera sonda oligonucleotídica y la segunda porción de marca se fija al extremo 5' de la segunda porción de hibridación de la segunda sonda oligonucleotídica. En otro modo de realización, la primera porción de marca se fija al extremo 3' de la primera porción de hibridación de la primera sonda oligonucleotídica y la segunda porción de marca se fija por medio de un conector a una región de la segunda porción de hibridación de la segunda sonda oligonucleotídica.
- 60 En un modo de realización, la primera porción de marca se fija al extremo 5' de la primera porción de hibridación de la primera sonda oligonucleotídica y la segunda porción de marca se fija al extremo 5' de la segunda porción de hibridación de la segunda sonda oligonucleotídica. En otro modo de realización, la primera porción de marca se fija al extremo 5' de la primera porción de hibridación de la primera sonda oligonucleotídica y la segunda porción de marca se fija al extremo 3' de la segunda porción de hibridación de la segunda sonda oligonucleotídica. En otro modo de realización, la primera porción de marca se fija al extremo 5' de la primera porción de hibridación de la primera sonda oligonucleotídica y la segunda porción de marca se fija por medio de un conector a una región de la segunda porción de hibridación de la segunda sonda oligonucleotídica.
- 65 En un modo de realización, la primera porción de marca se fija por medio de un conector a una región de la primera

porción de hibridación de la primera sonda oligonucleotídica y la segunda porción de marca se fija al extremo 5' de la segunda porción de hibridación de la segunda sonda oligonucleotídica. En otro modo de realización, la primera porción de marca se fija por medio de un conector a una región de la primera porción de hibridación de la primera sonda oligonucleotídica y la segunda porción de marca se fija al extremo 3' de la segunda porción de hibridación de la segunda sonda oligonucleotídica. En otro modo de realización, la primera porción de marca se fija por medio de un conector a una región de la primera porción de hibridación de la primera sonda oligonucleotídica y la segunda porción de marca se fija por medio de un conector a una región de la segunda porción de hibridación de la segunda sonda oligonucleotídica.

- 5           10          En un modo de realización, cualquiera de la primera porción de marca de la primera sonda oligonucleotídica o el primer oligonucleótido de extinción o la segunda porción de marca de la segunda sonda oligonucleotídica o el segundo oligonucleótido de extinción o cualquier combinación de los mismos contiene una o más modificaciones de nucleótidos. En un modo de realización, la una o más modificaciones de nucleótidos se selecciona del grupo que consiste en ácido nucleico bloqueado (LNA), ácido peptidónucleico (PNA), ácido nucleico con puente (BNA), sustitución de 2'-O-alquilo, nucleótido L-enantiomérico o combinaciones de los mismos.
- 15

También se divulga, sin embargo no forma parte de la invención, un kit para detectar dos o más secuencias de ácido nucleico diana en una muestra que comprende: (a) dos o más pares de cebadores oligonucleotídicos con secuencias que son complementarias a cada hebra de las dos o más secuencias de ácido nucleico diana; (b) al menos una sonda oligonucleotídica que comprende dos porciones distintas, una porción de hibridación que comprende una secuencia al menos parcialmente complementaria a una de las más de una secuencia de ácido nucleico diana y se hibrida dentro de dicha una de las más de una secuencia de ácido nucleico diana, en la que la porción de hibridación comprende un primer resto extintor; y una porción de marca fijada al extremo 5' o al extremo 3' de la primera porción de hibridación o fijada por medio de un conector a una región de la porción de hibridación, y que comprende una secuencia de nucleótidos que no es complementaria a las más de una secuencia de ácido nucleico diana, en la que la porción de marca comprende un resto fluorescente con una señal detectable que se puede extinguir por el primer resto extintor en la porción de hibridación, en la que dicho resto fluorescente está separado del primer resto extintor por un sitio de escisión susceptible a nucleasa; (c) al menos un oligonucleótido de extinción que comprende una secuencia de nucleótidos al menos parcialmente complementaria a la porción de marca de la sonda oligonucleotídica y se hibrida a la porción de marca para formar un dúplex, en el que el oligonucleótido de extinción comprende un segundo resto extintor que extingue la señal detectable generada por el resto fluorescente en la porción de marca cuando el oligonucleótido de extinción se hibrida a la porción de marca. También se divulga que la porción de marca de la sonda oligonucleotídica o el oligonucleótido de extinción o tanto la porción de marca de la sonda oligonucleotídica como el oligonucleótido de extinción contienen una o más modificaciones de nucleótidos en las que la una o más modificaciones de nucleótidos se selecciona del grupo que consiste en ácido nucleico bloqueado (LNA), ácido peptidónucleico (PNA), ácido nucleico con puente (BNA), sustitución de 2'-O-alquilo, nucleótido L-enantiomérico o combinaciones de los mismos.

#### Breve descripción de los dibujos

- 40           La FIG. 1 es una descripción gráfica de un modo de realización de la sonda oligonucleotídica usada para realizar los procedimientos de la invención.
- 45           La FIG. 2 es una representación gráfica del procedimiento de la invención que muestra la separación de la porción de marca y la posterior disociación del oligonucleótido de extinción.
- 50           La FIG. 3 es una descripción de un modo de realización de los procedimientos de la presente invención.
- 55           La FIG. 4 muestra las temperaturas de detección de señales usando otro modo de realización de los procedimientos de la presente invención.
- 60           La FIG. 5 muestra diferentes modos de realización de las sondas oligonucleotídicas usadas para poner en práctica los procedimientos de la presente invención.
- 65           La FIG. 6 muestra los resultados de la hibridación y disociación a dos temperaturas entre un oligonucleótido de extinción y un oligonucleótido complementario marcado de forma fluorescente como se describe en el ejemplo 1.
- 70           La FIG. 7 muestra las curvas de crecimiento de PCR generadas a partir de un molde de control interno (GIC) a 0, 100, 1000 o 10.000 cop./reac. usando una sonda TaqMan® estándar G0 y lecturas de fluorescencia de FAM a 58 °C y en ausencia de molde de grupo M de VIH-1 (HIM) (FIG. 7A) o en presencia de HIM a 10 cop./reac. (FIG. 7B), 100 cop./reac. (FIG. 7C) y 1000 cop./reac. (FIG. 7D).
- 75           La FIG. 8 muestra las curvas de crecimiento de PCR generadas a partir de HIM a 0, 10, 100 o 1000 cop./reac. usando una sonda marcada (L24) con un oligonucleótido de extinción complementario (Q9) y lecturas de fluorescencia de FAM a 80 °C y en ausencia de GIC (FIG. 8A) o en presencia de GIC a 100 cop./reac. (FIG. 8B), 1000 cop./reac. (FIG. 8C) y 10.000 cop./reac (FIG. 8D).

La FIG. 9 muestra las curvas de crecimiento derivadas de HIM a 0,10, 100 o 1000 cop./reac. generadas al restar un 84 % de las señales de fluorescencia a 58 °C de las señales de fluorescencia a 80 °C en ausencia de GIC (FIG. 9A) o en presencia de GIC a 100 cop./reac. (FIG. 9B), 1000 cop./reac. (FIG. 9C) y 10.000 cop./reac. (FIG. 9D).

5 Las FIGS. 10A y 10B muestran las curvas de crecimiento de PCR generadas a partir de un molde de control interno (GIC) o un molde de VIH (VIH), o ambos moldes de GIC y VIH (G+H) usando una sonda de GIC TaqMan® estándar (G0) y una sonda de VIH marcada (L24) con oligonucleótido de extinción complementario (Q9) en el que ambas sondas están marcadas con FAM (FIG. 10A, fila superior), con HEX (FIG. 10A, fila inferior), con tinte JA270 (FIG. 10B, fila superior) o con Cy5.5 (FIG. 10B, fila inferior).

10 Las FIGS. 11A, 11B y 11C muestran las curvas de crecimiento de PCR del experimento como se describe en el ejemplo 4 en el que la sonda marcada L24 contiene L-ADN en lugar de D-ADN con lecturas de fluorescencia de FAM a 58 °C (FIG. 11A), lecturas de fluorescencia de FAM a 80 °C (FIG. 11B) y un 84 % de las señales de fluorescencia a 58 °C restadas de las señales de fluorescencia a 80 °C (FIG. 11C).

15 La FIG. 12 muestra las curvas de crecimiento de PCR del experimento como se describe en el ejemplo 5 en el que se midió la detección de señales de fluorescencia a 58 °C, 75 °C, 88 °C o 97 °C en presencia de una sonda de GIC TaqMan® estándar (IC-QF), una sonda de VIH marcada (L24) con un oligonucleótido de extinción que tiene nucleótidos A y G modificados con sustituciones de 2'-OMe (Q9-OMe A/G), una sonda de VIH marcada que tiene todos los nucleótidos modificados con sustituciones de 2'OMe (L24-OMe) con un oligonucleótido de extinción (Q9-OMe A/G) y una sonda de VIH marcada (L24-OMe) con un oligonucleótido de extinción que tiene todos los nucleótidos modificados con sustituciones de 2'-OMe (Q9-OMe).

## 25 Descripción detallada de la invención

### Definiciones

30 El término "muestra" como se usa en el presente documento incluye una muestra o cultivo (por ejemplo, cultivos microbiológicos) que incluye ácidos nucleicos. El término "muestra" también pretende incluir muestras tanto biológicas como ambientales. Una muestra puede incluir una muestra de origen sintético. Las muestras biológicas incluyen sangre completa, suero, plasma, sangre del cordón umbilical, vellosidades coriónicas, líquido amniótico, líquido cefalorraquídeo, líquido de lavado (por ejemplo, broncoalveolar, gástrico, peritoneal, ductal, del oído, artroscópico), muestra de biopsia, orina, heces, esputo, saliva, mucosa nasal, líquido prostático, semen, líquido linfático, bilis, lágrimas, sudor, leche materna, líquido mamario, células embrionarias y células fetales. En un modo de realización preferente, la muestra biológica es sangre y, más preferentemente, plasma. Como se usa en el presente documento, el término "sangre" engloba sangre completa o cualquier fracción de sangre, tal como suero y plasma como se define convencionalmente. El plasma sanguíneo se refiere a la fracción de sangre completa resultante de la centrifugación de sangre tratada con anticoagulantes. El suero sanguíneo se refiere a la porción acuosa de líquido restante después de que se ha coagulado una muestra de sangre. Las muestras ambientales incluyen material ambiental tal como materia de superficie, suelo, agua y muestras industriales, así como muestras obtenidas de instrumentos, aparatos, equipos, utensilios y artículos desechables y no desechables para el procesamiento de alimentos y lácteos. Estos ejemplos no se han de interpretar como limitantes de los tipos de muestras aplicables a la presente invención.

45 Los términos "diana" o "ácido nucleico diana" como se usan en el presente documento pretenden querer decir cualquier molécula con una presencia que se va a detectar o medir o con una función, interacciones o propiedades que se van a estudiar. Por lo tanto, una diana incluye esencialmente cualquier molécula para la que existe una sonda detectable (por ejemplo, sonda oligonucleotídica) o ensayo, o que se puede producir por un experto en la técnica. Por ejemplo, una diana puede ser una biomolécula, tal como una molécula de ácido nucleico, un polipéptido, un lípido o un carbohidrato, que se puede unir con o entrar en contacto de otro modo con una sonda detectable (por ejemplo, un anticuerpo), en la que la sonda detectable también comprende ácidos nucleicos que se pueden detectar por procedimientos de la invención. Como se usa en el presente documento, "sonda detectable" se refiere a cualquier molécula o agente que se puede hibridar a una biomolécula diana de interés y permite la detección específica de la biomolécula diana como se describe en el presente documento. En un aspecto de la invención, la diana es un ácido nucleico y la sonda detectable es un oligonucleótido. Los términos "ácido nucleico" y "molécula de ácido nucleico" se pueden usar de manera intercambiable a lo largo de la divulgación. Los términos se refieren a oligonucleótidos, polinucleótidos, desoxirribonucleótido (ADN), ADN genómico, ADN mitocondrial (ADNmt), ADN complementario (ADNc), ADN bacteriano, ADN vírico, ARN vírico, ARN, ARN mensajero (ARNm), ARN de transferencia (ARNt), ARN ribosomal (ARNr), ARNip, ARN catalítico, clones, plásmidos, M13, P1, cósmido, cromosoma artificial bacteriano (CAB), cromosoma artificial de levadura (CAL), ácido nucleico amplificado, amplicón, producto de PCR y otros tipos de ácido nucleico amplificado, híbridos de ARN/ADN y ácidos nucleicos de poliamida (PNA), de los que todos pueden estar en forma mono- o bicatenaria y, a menos que se limite de otro modo, englobarán los análogos conocidos de nucleótidos naturales que pueden funcionar de manera similar a los nucleótidos naturales y combinaciones y/o mezclas de los mismos. Por tanto, el término "nucleótidos" se refiere tanto a los nucleótidos naturales como a los modificados/no naturales, incluyendo los nucleósidos tri, di

y monofosfato, así como los monómeros monofosfato presentes en ácido polinucleico u oligonucleótido. Un nucleótido también puede ser un ribo; 2'-desoxi; 2',3'-desoxi, así como una amplia gama de otros miméticos nucleotídicos que son bien conocidos en la técnica. Los miméticos incluyen nucleótidos de terminación de cadena, tales como 3'-O-metilo, sustituciones glucídicas o de base halogenada; estructuras glucídicas alternativas

5 incluyendo estructuras de anillo alquilo no glucídicas; bases alternativas incluyendo inosina; modificados con desaza; modificados con conector de chi y psi; modificados con marcador de masa; modificaciones o reemplazos de fosfodiéster incluyendo fosforotioato, metilfosfonato, boranofosfato, amida, éster, éter; y un reemplazo internucleotídico básico o completo, incluyendo enlaces de escisión tales como restos de nitrofenilo fotoescindibles.

10 La presencia o ausencia de una diana se puede medir cuantitativa o cualitativamente. Las dianas se pueden presentar en una variedad de formas diferentes que incluyen, por ejemplo, mezclas simples o complejas, o en formas sustancialmente purificadas. Por ejemplo, una diana puede ser parte de una muestra que contiene otros componentes o puede ser el componente único o principal de la muestra. Por lo tanto, una diana puede ser un componente de una célula o tejido completos, un extracto de célula o tejido, un lisado fraccionado de los mismos 15 o una molécula sustancialmente purificada. Además, una diana puede tener una secuencia o estructura conocida o bien desconocida.

El término "reacción de amplificación" se refiere a cualquier medio *in vitro* para multiplicar las copias de una secuencia diana de ácido nucleico.

20 "Amplificar" se refiere a una etapa de someter una solución a condiciones suficientes para permitir la amplificación. Los componentes de una reacción de amplificación pueden incluir, pero no se limitan a, por ejemplo, cebadores, un molde polinucleotídico, polimerasa, nucleótidos, dNTP y similares. El término "amplificar" típicamente se refiere a un incremento "exponencial" en el ácido nucleico diana. Sin embargo, "amplificar" como se usa en el presente documento también se puede referir a incrementos lineales en los números de una secuencia diana seleccionada de ácido nucleico, pero es diferente de una etapa de extensión de cebador individual, una sola vez.

30 La "reacción en cadena de la polimerasa" o "PCR" se refiere a un procedimiento con lo que un segmento o subsecuencia específicos de un ADN bicatenario diana se amplifica en una progresión geométrica. La PCR es bien conocida por los expertos en la técnica; véanse, por ejemplo, las patentes de EE. UU. n.<sup>os</sup> 4.683.195 y 4.683.202; y PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications, Innis *et al.*, eds, 1990.

35 "Oligonucleótido" como se usa en el presente documento se refiere a oligómeros lineales de monómeros nucleosídicos naturales o modificados enlazados por enlaces fosfodiéster o análogos de los mismos.

40 Los oligonucleótidos incluyen desoxirribonucleósidos, ribonucleósidos, formas anoméricas de los mismos, ácidos peptidónucleicos (PNA) y similares, que se pueden unir específicamente a un ácido nucleico diana. Normalmente, los monómeros se enlazan por enlaces fosfodiéster o análogos de los mismos para formar oligonucleótidos que varían en tamaño de unas pocas unidades monómeras, por ejemplo, 3-4, a varias decenas de unidades monómeras, por ejemplo, 40-60. Cada vez que un oligonucleótido se representa por una secuencia de letras, tal como "ATGCCCTG", se entenderá que los nucleótidos están en orden 5'-3' de izquierda a derecha y que "A" indica desoxiadenosina, "C" indica desoxicitidina, "G" indica desoxiguanosina, "T" indica desoxitimidina y "U" indica el ribonucleósido uridina, a menos que se indique de otro modo. Normalmente, los oligonucleótidos comprenden los cuatro desoxinucleótidos naturales; sin embargo, también pueden comprender ribonucleósidos o análogos 45 nucleotídicos no naturales. Cuando una enzima tiene requisitos de sustratos oligonucleotídicos o polinucleotídicos específicos para la actividad, por ejemplo, ADN monocatenario, dúplex ARN/ADN o similar, entonces la selección de la composición apropiada para los sustratos oligonucleotídicos o polinucleotídicos está dentro del conocimiento de un experto en la técnica.

50 Como se usa en el presente documento, "cebador oligonucleotídico", o simplemente "cebador", se refiere a una secuencia de polinucleótidos que se hibrida a una secuencia en un molde de ácido nucleico diana y facilita la detección de una sonda oligonucleotídica. En los modos de realización de amplificación de la invención, un cebador oligonucleotídico sirve como punto de inicio de la síntesis de ácidos nucleicos. En modos de realización distintos de amplificación, se puede usar un cebador oligonucleotídico para crear una estructura que se puede escindir por un agente de escisión. Los cebadores pueden ser de una variedad de longitudes y a menudo son de menos de 50 nucleótidos de longitud, por ejemplo 12-25 nucleótidos de longitud. La longitud y las secuencias de cebadores para su uso en PCR se pueden diseñar en base a principios conocidos por los expertos en la técnica.

60 El término "sonda oligonucleotídica", como se usa en el presente documento, se refiere a una secuencia de polinucleótidos que se puede hibridar a un ácido nucleico diana de interés y permite la detección específica del ácido nucleico diana.

65 Un "resto indicador" o "molécula indicadora" es una molécula que confiere una señal detectable. El fenotipo detectable puede ser colorimétrico, fluorescente o luminiscente, por ejemplo. Un "resto extintor" o "molécula extintora" es una molécula que puede extinguir la señal detectable del resto indicador.

Un "nucleótido con emparejamiento erróneo" o un "emparejamiento erróneo" se refiere a un nucleótido que no es complementario a la secuencia diana en esa posición o posiciones. Una sonda oligonucleotídica puede tener al menos un emparejamiento erróneo, pero también puede tener 2, 3, 4, 5, 6 o 7 o más nucleótidos con emparejamiento erróneo.

5 El término "polimorfismo", como se usa en el presente documento, se refiere a una variante alélica. Los polimorfismos pueden incluir polimorfismos mononucleotídicos (SNP), así como polimorfismos de longitud de secuencia simple. Un polimorfismo se puede deber a una o más sustituciones de nucleótidos en un alelo en comparación con otro alelo o se puede deber a una inserción o delección, duplicación, inversión y otras alteraciones 10 conocidas en la técnica.

15 El término "modificación", como se usa en el presente documento, se refiere a alteraciones de la sonda oligonucleotídica a nivel molecular (por ejemplo, resto de base, resto glucídico o cadena principal de fosfato). Las modificaciones de nucleósidos incluyen, pero no se limitan a, la introducción de bloqueadores de escisión o inductores de escisión, la introducción de ligandos del surco menor, enriquecimiento isotópico, disminución isotópica, la introducción de deuterio y modificaciones de halógeno. Las modificaciones de nucleósidos también 20 pueden incluir restos que incrementan la restricción de la hibridación o incrementan la temperatura de fusión de la sonda oligonucleotídica. Por ejemplo, una molécula de nucleótido se puede modificar con un puente adicional que conecta los carbonos 2' y 4' dando como resultado un nucleótido de ácido nucleico bloqueado (LNA) que es resistente a la escisión por una nucleasa (como se describe en Imanishi *et al.*, patente de EE. UU. n.º 6.268.490 y en Wengel *et al.*, patente de EE. UU. n.º 6.794.499). Las composiciones de la porción de marca de la sonda oligonucleotídica y de la molécula oligonucleotídica de extinción solo se restringen por su capacidad para formar dúplex estables. Por lo tanto, estos oligonucleótidos pueden comprender ADN, L-ADN, ARN, L-ARN, LNA, L-LNA, 25 PNA (ácido peptidónucleico, como se describe en Nielsen *et al.*, patente de EE. UU. n.º 5.539.082), BNA (ácido nucleico con puente, por ejemplo, 2',4'-BNA(NC) [ácido nucleico con puente 2'-O,4'-C-aminometileno] como se describe en Rahman *et al.*, J. Am. Chem. Soc. 2008; 130(14):4886-96), L-BNA, etc., (donde "L-XXX" se refiere al enantiómero L de la unidad glucídica de los ácidos nucleicos) o cualquier otra variación y modificación conocida 30 en las cadenas principales de fosfodiéster, glúcidos o bases de nucleótidos.

35 Otros ejemplos de modificaciones de nucleósidos incluyen diversas sustituciones en 2' tales como grupos halo, alcoxi y alilio que se introducen en el resto glucídico de los oligonucleótidos. Se han presentado pruebas de que los polinucleótidos 2'-sustituidos-2'-desoxiadenosina se parecen a ARN bicatenario más que a ADN. Ikebara *et al.*, (Nucleic Acids Res., 1978, 5, 3315) han demostrado que un sustituyente 2'-fluoro en poli A, poli I o poli C duplicado a su complemento es significativamente más estable que el dúplex de ribonucleótido o desoxirribonucleótido y poli 40 como se determina por ensayos de fusión estándar. Inoue *et al.*, (Nucleic Acids Res., 1987, 15, 6131) han descrito la síntesis de secuencias oligonucleotídicas mixtas que contienen sustituyentes 2'-OMe (O-metil) en cada nucleótido nucleico. El oligonucleótido 2'-OMe-sustituido mixto se hibridó a su complemento de ARN tan fuertemente como el dúplex ARN-ARN que es significativamente más fuerte que el heterodúplex ARN-ADN de la misma secuencia. Por lo tanto, los ejemplos de sustituciones en la posición 2' del glúcido incluyen F, CN, CF<sub>3</sub>, OCF<sub>3</sub>, OMe, OCN, O-alquilo, S-alquilo, SMe, SO<sub>2</sub>Me, ONO<sub>2</sub>, NO<sub>2</sub>, NH<sub>3</sub>, NH<sub>2</sub>, NH-alquilo, OCH<sub>3</sub>=CH<sub>2</sub> y OCCH<sub>3</sub>.

45 El término "específico" o "especificidad" en referencia a la unión de una molécula a otra molécula, tal como una sonda para un polinucleótido diana, se refiere al reconocimiento, contacto y formación de un complejo estable entre las dos moléculas, conjuntamente con reconocimiento, contacto o formación de complejo sustancialmente menores de esa molécula con otras moléculas. Como se usa en el presente documento, el término "hibridar" se refiere a la formación de un complejo estable entre dos moléculas.

50 Una sonda se "puede hibridar" a una secuencia de ácido nucleico si al menos una región de la sonda comparte una identidad de secuencia sustancial con al menos una región del complemento de la secuencia de ácido nucleico. La "identidad de secuencia sustancial" es una identidad de secuencia de al menos aproximadamente un 80 %, preferentemente al menos aproximadamente un 85 %, más preferentemente al menos aproximadamente un 90 %, 95 % o 99 %, y lo más preferentemente un 100 %. Con el propósito de determinar la identidad de secuencia de una secuencia de ADN y una secuencia de ARN, U y T a menudo se consideran el mismo nucleótido. Por ejemplo, una sonda que comprende la secuencia ATCAGC se puede hibridar a una secuencia de ARN diana que comprende 55 la secuencia GCUGAU.

60 El término "agente de escisión" como se usa en el presente documento se refiere a cualquier medio que pueda escindir una sonda oligonucleotídica para proporcionar fragmentos, incluyendo pero sin limitarse a enzimas. Para los procedimientos en los que no se produce amplificación, el agente de escisión puede servir únicamente para escindir, degradar o separar de otro modo la segunda porción de la sonda oligonucleotídica o fragmentos de la misma. El agente de escisión puede ser una enzima. El agente de escisión puede ser natural, sintético, no modificado o modificado.

65 Para los procedimientos en los que se produce amplificación, el agente de escisión es preferentemente una enzima que posee actividad sintética (o de polimerización) y actividad nucleasa. Una enzima de este tipo a menudo es una enzima de amplificación de ácido nucleico. Un ejemplo de una enzima de amplificación de ácido nucleico es una

enzima ácido nucleico polimerasa tal como ADN polimerasa de *Thermus aquaticus* (Taq) (TaqMan®) o ADN polimerasa I de *E. coli*. La enzima puede ser natural, no modificada o modificada.

5 Una "ácido nucleico polimerasa" se refiere a una enzima que cataliza la incorporación de nucleótidos a un ácido nucleico. Las ácido nucleico polimerasas ejemplares incluyen ADN polimerasas, ARN polimerasas, transferasas terminales, retrotranscriptasas, telomerasas y similares.

10 Una "ADN polimerasa termoestable" se refiere a una ADN polimerasa que es estable (es decir, resiste la degradación o la desnaturalización) y conserva suficiente actividad catalítica cuando se somete a temperaturas elevadas durante períodos de tiempo seleccionados. Por ejemplo, una ADN polimerasa termoestable conserva suficiente actividad para efectuar reacciones de extensión de cebador posteriores, cuando se somete a temperaturas elevadas durante el tiempo necesario para desnaturalizar los ácidos nucleicos bicatenarios. Las condiciones de calentamiento necesarias para la desnaturalización de ácido nucleico son bien conocidas en la técnica y se ejemplifican en las patentes de EE. UU. n.ºs 4.683.202 y 4.683.195. Como se usa en el presente documento, una polimerasa termoestable es típicamente adecuada para su uso en una reacción de termociclación tal como la reacción en cadena de la polimerasa ("PCR"). Los ejemplos de ácido nucleico polimerasas termoestables incluyen ADN polimerasa de *Thermus aquaticus* Taq, polimerasa de *Thermus sp.* Z05, polimerasa de *Thermus flavus*, polimerasas de *Thermotoga maritima*, tales como las polimerasas TMA-25 y TMA-30, ADN polimerasa de Tth y similares.

15 20 Una polimerasa "modificada" se refiere a una polimerasa en la que al menos un monómero difiere de la secuencia de referencia, tal como una forma natural de la polimerasa u otra forma modificada de la polimerasa. Las modificaciones ejemplares incluyen inserciones, delecciones y sustituciones de monómeros. Las polimerasas modificadas también incluyen polimerasas químéricas que tienen secuencias de componentes identificables (por ejemplo, dominios estructurales o funcionales, etc.) derivadas de dos o más orígenes. También se incluyen dentro de la definición de polimerasas modificadas las que comprenden modificaciones químicas de la secuencia de referencia. Los ejemplos de polimerasas modificadas incluyen ADN polimerasa G46E E678G CS5, ADN polimerasa G46E L329A E678G CS5, ADN polimerasa G46E L329A D640G S671F CS5, ADN polimerasa G46E L329A D640G S671F E678G CS5, una ADN polimerasa G46E E678G CS6, ADN polimerasa Z05, polimerasa

25 30 ΔZ05, polimerasa ΔZ05-Gold, polimerasa ΔZ05R, ADN polimerasa Taq E615G, polimerasa TMA-25 E678G, polimerasa TMA-30 E678G y similares.

35 35 El término "actividad nucleasa 5' a 3'" o "actividad nucleasa 5'-3'" se refiere a una actividad de una ácido nucleico polimerasa, típicamente asociada con la síntesis de hebra de ácido nucleico, con lo que los nucleótidos se retiran del extremo 5' de la hebra de ácido nucleico, por ejemplo, la ADN polimerasa I de *E. coli* tiene esta actividad, mientras que el fragmento Klenow no. Algunas enzimas que tienen actividad nucleasa 5' a 3' son exonucleasas 5' a 3'. Los ejemplos de dichas exonucleasas 5' a 3' incluyen: exonucleasa de *B. subtilis*, fosfodiesterasa de bazo, exonucleasa λ, exonucleasa II de levadura, exonucleasa V de levadura y exonucleasa de *Neurospora crassa*.

40 40 El término "propanodiol" o "espaciador propanodiol" se refiere a 1,3-propanodiol y es sinónimo de propano-1,3-diol, 1,3-dihidroxipropano y trimetilenglicol. El término "HEG" o "espaciador HEG" se refiere a hexaetilenglicol, que es sinónimo de 3,6,9,12,15-pentaoxaheptadecano-1,17-diol.

45 45 Diversos aspectos de la presente invención se basan en una propiedad especial de las ácido nucleico polimerasas. Las ácido nucleico polimerasas pueden tener varias actividades, entre ellas, una actividad nucleasa 5' a 3' con lo que la ácido nucleico polimerasa puede escindir mononucleótidos u oligonucleótidos pequeños de un oligonucleótido hibridoado a su polinucleótido complementario más grande. Para que se produzca la escisión eficazmente, un oligonucleótido hacia 5' también se debe hibridar al mismo polinucleótido más grande.

50 50 La detección de un ácido nucleico diana utilizando la actividad nucleasa 5' a 3' se puede realizar por un ensayo "TaqMan®" o "ensayo de nucleasa en 5'", como se describe en las patentes de EE. UU. n.ºs 5.210.015; 5.487.972 y 5.804.375; y en Holland *et al.*, 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:7276-7280. En el ensayo TaqMan®, las sondas de detección marcadas que se hibridan dentro de la región amplificada están presentes durante la reacción de amplificación. Las sondas se modifican para evitar que las sondas actúen como cebadores para la síntesis de ADN. La amplificación se realiza usando una ADN polimerasa que tiene actividad exonucleasa 5' a 3'. Durante cada etapa de síntesis de la amplificación, cualquier sonda que se hibrida al ácido nucleico diana hacia 3' del cebador que se está extendiendo se degrada por la actividad exonucleasa 5' a 3' de la ADN polimerasa. Por tanto, la síntesis de una nueva hebra diana también da como resultado la degradación de una sonda, y la acumulación de producto de degradación proporciona una medida de la síntesis de secuencias diana.

60 60 Cualquier procedimiento adecuado para detectar el producto de degradación se puede usar en un ensayo de nucleasa en 5'. A menudo, la sonda de detección se marca con dos tintes fluorescentes, de los que uno puede extinguir la fluorescencia del otro tinte. Los tintes se fijan a la sonda, típicamente con el tinte indicador o detector fijado al extremo 5' y el tinte de extinción fijado a un sitio interno, de modo que la extinción se produce cuando la sonda está en un estado no hibridoado y de modo que la escisión de la sonda por la actividad exonucleasa 5' a 3' de la ADN polimerasa se produce entre los dos tintes. La amplificación da como resultado la escisión de la sonda

entre los tintes con una eliminación concomitante de la extinción y un incremento en la fluorescencia observable a partir del tinte inicialmente extinguido. Se sigue la acumulación del producto de degradación midiendo el incremento en la fluorescencia de reacción. Las patentes de EE. UU. n.<sup>os</sup> 5.491.063 y 5.571.673 describen procedimientos alternativos para detectar la degradación de la sonda que se produce de forma concomitante con la amplificación.

5 Un ensayo de nucleasa en 5' para la detección de un ácido nucleico diana puede emplear cualquier polimerasa que tenga una actividad exonucleasa 5' a 3'. Por tanto, en algunos modos de realización, las polimerasas con actividad nucleasa en 5' son ácido nucleico polimerasas termoestables y termoactivas. Dichas polimerasas termoestables incluyen, pero no se limitan a, formas naturales y recombinantes de polimerasas de una variedad 10 de especies de los géneros eubacterianos *Thermus*, *Thermatoga* y *Thermosiphon*, así como formas químéricas de las mismas. Por ejemplo, las polimerasas de la especie *Thermus* que se pueden usar en los procedimientos de la invención incluyen ADN polimerasa de *Thermus aquaticus* (*Taq*), ADN polimerasa de *Thermus thermophilus* (*Tth*), ADN polimerasa de la especie *Thermus* Z05 (Z05), la especie *Thermus* sps17 (sps17) y la especie *Thermus* Z05 (por ejemplo, descrita en las patentes de EE. UU. n.<sup>os</sup> 5.405.774, 5.352.600, 5.079.352, 4.889.818, 5.466.591, 15 5.618.711, 5.674.738 y 5.795.762. Las polimerasas de *Thermatoga* que se pueden usar en los procedimientos de la invención incluyen, por ejemplo, ADN polimerasa de *Thermatoga maritima* y ADN polimerasa de *Thermatoga neapolitana*, mientras que un ejemplo de una polimerasa de *Thermosiphon* que se puede usar es ADN polimerasa de *Thermosiphon africanus*. Las secuencias de las ADN polimerasas de *Thermatoga maritima* y *Thermosiphon africanus* están publicadas en la solicitud de patente internacional n.<sup>o</sup> PCT/US91/07035 con la publicación n.<sup>o</sup> WO 20 20 92/06200. La secuencia de *Thermatoga neapolitana* se puede encontrar en la publicación de patente internacional n.<sup>o</sup> WO 97/09451.

En el ensayo de nucleasa en 5', la detección de amplificación es típicamente simultánea con la amplificación (es decir, "ultrarrápida"). En algunos modos de realización, la detección de amplificación es cuantitativa y la detección 25 de amplificación es ultrarrápida. En algunos modos de realización, la detección de amplificación es cualitativa (por ejemplo, detección de punto final de la presencia o ausencia de un ácido nucleico diana). En algunos modos de realización, la detección de amplificación es posterior a la amplificación. En algunos modos de realización, la detección de amplificación es cualitativa y la detección de amplificación es posterior a la amplificación.

30 En la presente invención, la amplificación por PCR ultrarrápida y la detección de dos o más ácidos nucleicos diana en un recipiente de reacción individual (por ejemplo, tubo, pocillo) se puede realizar usando una sonda oligonucleotídica TaqMan<sup>®</sup> estándar para detectar la presencia de la primera diana y una o más sondas oligonucleotídicas TaqMan<sup>®</sup> novedosas para detectar la presencia de la segunda, tercera o más dianas, 35 conteniendo todas las sondas el mismo marcador fluorescente. De forma alternativa, las sondas oligonucleotídicas TaqMan<sup>®</sup> novedosas se pueden usar para detectar la presencia de todos los ácidos nucleicos diana. Las sondas novedosas tienen dos rasgos característicos distintivos.

El primer rasgo característico de la sonda novedosa es que comprende dos porciones distintas. La primera porción 40 se denomina porción de hibridación y comprende una secuencia que es al menos parcialmente complementaria a una secuencia de ácido nucleico diana de modo que se puede hibridar con la secuencia diana. La porción de hibridación también contiene un resto extintor. En un modo de realización, la porción de hibridación contiene un resto indicador tal como un tinte fluorescente que puede extinguir el resto extintor y se separa del resto extintor por un sitio de escisión susceptible a nucleasa. La segunda porción de la sonda oligonucleotídica se denomina porción de marca. En un modo de realización, la porción de marca se fija al extremo 5' de la porción de hibridación. En otro modo de realización, la porción de marca se fija al extremo 3' de la porción de hibridación. En otro modo de realización, la porción de marca se fija en cualquier lugar entre el extremo 5' y el extremo 3' de la porción de hibridación por medio de un conector. La porción de marca puede comprender una secuencia de nucleótidos que 45 no es complementaria a la secuencia de ácido nucleico diana y forma una región de "aleta" que no se puede unir al ácido nucleico diana (véase la FIG. 1 para una representación gráfica de una sonda de aleta en 5'). La porción de marca también puede estar compuesta de no nucleótidos tales como cualquier resto orgánico, o unidades repetidas (por ejemplo, (CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O)<sub>n</sub>, etc.) siempre que se pueda fijar a la porción de hibridación y pueda interactuar con una molécula de extinción (como se describe en la siguiente sección). En un modo de realización, 50 la porción de marca contiene un resto indicador tal como un tinte fluorescente que se puede extinguir por el resto extintor en la porción de hibridación. Las porciones de hibridación y de marca de la sonda oligonucleotídica se pueden separar opcionalmente por un "conector" no nucleotídico. Este conector puede estar compuesto de carbono, carbono y oxígeno, carbono y nitrógeno, o cualquier combinación de estos y puede ser de cualquier longitud. Además, el conector puede estar compuesto de un resto lineal o un resto cíclico. El conector se puede derivar de una unidad individual o de múltiples unidades idénticas o diferentes separadas por enlaces fosfato. El propósito del conector es crear una región en el punto de unión de las porciones de hibridación y de marca de la 55 sonda oligonucleotídica. Cuando la porción de marca se separa de la porción de hibridación, el conector también puede evitar que la porción de marca se extienda por una ácido nucleico polimerasa. De forma alternativa, otra modificación en la porción de marca separada la hace no extensible por la ácido nucleico polimerasa.

60 El segundo rasgo característico de la sonda novedosa es que la porción de marca se une a una molécula de extinción. Si la porción de marca es una secuencia de nucleótidos, la molécula de extinción puede ser un oligonucleótido que es total o parcialmente complementario a la secuencia de nucleótidos de la porción de marca 65

- y se hibrida a la porción de marca. La molécula de extinción también contiene o está asociada con un resto extintor, es decir, un segundo resto extintor, que también puede extinguir la señal del resto indicador (por ejemplo, tinte fluorescente) en la porción de marca. El resto extintor en o asociado con la molécula de extinción (el segundo resto extintor) puede ser el mismo o diferente del resto extintor en la porción de hibridación (el primer resto extintor). Por lo tanto, antes de realizar la amplificación por PCR, el resto indicador en la porción de marca se extingue tanto por el resto extintor en la porción de hibridación de la sonda como por el resto extintor en o asociado con la molécula de extinción (por ejemplo, por un oligonucleótido de extinción como se muestra en FIG. 1).
- A continuación se describe el principio general del uso de la sonda novedosa para realizar la amplificación por PCR ultrarrápida y la detección del ácido nucleico diana en un ensayo de nucleasa en 5'. En primer lugar, se proporciona una muestra que se sospecha que contiene el ácido nucleico diana. A continuación, se pone en contacto la muestra en el interior de un recipiente de reacción individual (por ejemplo, un tubo de ensayo individual o un pocillo individual en una microplaca de múltiples pocillos) con reactivos de PCR que contienen tanto los cebadores oligonucleotídicos que pueden generar amplicones del ácido nucleico diana como la sonda oligonucleotídica novedosa. La amplificación por PCR comienza usando una ácido nucleico polimerasa que tiene actividad nucleasa 5' a 3' de modo que durante la etapa de extensión de cada ciclo de PCR, la actividad nucleasa de la polimerasa permite la escisión y la separación de la porción de marca del resto de extinción en la porción de hibridación de la sonda. La porción de marca separada puede contener opcionalmente una modificación (tal como el conector no nucleotídico) de modo que no se puede extender por una ácido nucleico polimerasa.
- Seguidamente, la señal del resto indicador en la porción de marca separada se mide a una primera temperatura, normalmente, la temperatura de hibridación y/o extensión, a la que la molécula de extinción todavía está unida a la porción de marca. Debido a la presencia del resto extintor en o asociado con la molécula de extinción, la señal del resto indicador (por ejemplo, un tinte fluorescente) en la porción de marca todavía se extingue. A continuación, como etapa normal en un ciclo de PCR, la temperatura se eleva gradualmente hasta la temperatura de desnaturización. A medida que la temperatura se incrementa desde la temperatura de extensión hasta la temperatura de desnaturización, se alcanza un punto de temperatura en el que la molécula de extinción ya no está unida a la porción de marca. Si la molécula de extinción es un oligonucleótido que tiene secuencias complementarias a la secuencia de nucleótidos de la porción de marca, esta disociación se produce a la temperatura de fusión ( $T_f$ ) de la formación de dúplex entre la molécula oligonucleotídica de extinción y la porción de marca. La señal del resto indicador que ya no se extingue por el resto extintor en o asociado con el oligonucleótido de extinción se mide a continuación a una segunda temperatura que está en o por encima de la temperatura  $T_f$  del dúplex. De hecho, puede ser mejor que la segunda temperatura esté por encima de la temperatura  $T_f$  para garantizar que cerca de un 100 % de la porción de marca esté en forma monocatenaria. Sin embargo, también es posible medir la señal a una temperatura por debajo de la temperatura  $T_f$ . A continuación, se determina un valor de señal calculado restando la señal detectada a la primera temperatura cuando la molécula de extinción todavía está unida a la porción de marca de la señal detectada a la segunda temperatura cuando la molécula de extinción no está unida a la porción de marca (véanse la FIG. 2 y la FIG. 3). El valor de señal calculado se puede normalizar opcionalmente para la corrección de señales que se pueden ver afectadas por la temperatura. Por ejemplo, es conocido que las señales fluorescentes disminuyen a mayores temperaturas y, por lo tanto, se pueden usar patrones para normalizar los valores de señal obtenidos a diferentes temperaturas.
- Estas mediciones y cálculos de señal se realizan en múltiples ciclos de PCR y los valores de señal acumulados determinados se pueden usar para determinar no solo la presencia o ausencia, sino también la cantidad del ácido nucleico diana determinando el valor umbral (valor  $C_t$ ) a partir de una curva de crecimiento de PCR generada a partir de los valores de señal calculados trazados frente al número de ciclos de PCR. En un modo de realización, las mediciones y los cálculos de señal se realizan en cada ciclo de PCR.
- Son posibles ensayos de PCR múltiple que usan solo un resto indicador (por ejemplo, un tinte fluorescente) diseñando sondas oligonucleotídicas que tienen porciones de marca hibridadas a sus respectivas moléculas oligonucleotídicas de extinción a diversas temperaturas  $T_f$ . Por ejemplo, la amplificación y detección de tres ácidos nucleicos diana en una reacción se puede lograr usando tres sondas oligonucleotídicas todas marcadas con el mismo fluoróforo. Se puede usar una sonda oligonucleotídica TaqMan® estándar para detectar la primera diana midiendo la señal fluorescente a una primera temperatura (normalmente la temperatura de hibridación de un ciclo de PCR). Se puede usar una primera sonda "marcada" con un dúplex marca-oligonucleótido de extinción de  $T_f$  baja para detectar la segunda diana midiendo el valor fluorescente calculado a una segunda temperatura a o por encima de su temperatura  $T_f$  y que es mayor que la primera temperatura. Se puede usar una segunda sonda "marcada" con un dúplex marca-oligonucleótido de extinción de  $T_f$  alta para detectar la tercera diana midiendo el valor fluorescente calculado a una tercera temperatura a o por encima de su temperatura  $T_f$  y que es mayor que la segunda temperatura. (Véase la FIG. 4) Teóricamente, sería posible usar una sonda TaqMan® y dos sondas marcadas diferentes con de cuatro a siete restos indicadores diferentes (por ejemplo, tintes fluorescentes) para detectar entre 12 y 21 ácidos nucleicos diana diferentes en una reacción o una sonda TaqMan® y 3 sondas marcadas diferentes para detectar entre 16 y 28 ácidos nucleicos diana diferentes en una reacción.
- Adicionalmente, las sondas novedosas de la presente invención se pueden diseñar de modo que la porción de marca sea una secuencia de nucleótidos y se conecte a un oligonucleótido de extinción para formar una horquilla

(es decir, una estructura de tallo-bucle). En esta estructura, la porción de "tallos" consistirá en las regiones complementarias entre la porción de marca y el oligonucleótido de extinción mientras que la porción de "bucle" puede estar compuesta de nucleótidos no complementarios o no nucleótidos tales como conectores como se describe previamente.

- 5 Aunque se ha descrito que las sondas novedosas de la presente invención tienen el resto indicador localizado en la porción de marca de las sondas, también es posible situar el resto indicador en la porción de hibridación y colocar el primer resto extintor en la porción de marca, siempre que el resto indicador pueda interactuar de forma reversible con el segundo resto extintor de la molécula de extinción. En un sentido general, el resto indicador se diseña y se sitúa en el oligonucleótido de sonda de tal manera que se separa del primer resto de extinción en la porción de hibridación durante el ensayo de nucleasa en 5' (TaqMan<sup>®</sup>) y se diseña además para interactuar de forma reversible con el segundo resto de extinción en la molécula de extinción. Algunos de estos diversos modos de realización alternativos de las sondas novedosas se pueden ver en la FIG. 5.
- 10
- 15 Para poner en práctica los procedimientos de la presente invención, son necesarios determinados rasgos característicos en el diseño de la porción de marca del oligonucleótido de sonda y de la molécula de extinción. En un modo de realización, tanto la porción de marca como la molécula de extinción están compuestas de secuencias de nucleótidos. En esta situación, tanto la porción de marca como el oligonucleótido de extinción no se deben hibridar específicamente a la secuencia de ácido nucleico diana, pero deben ser total o parcialmente complementarios entre sí para permitir la hibridación a las temperaturas deseadas. Ambos pueden incluir una modificación en sus extremos 3' para no extenderse por la ácido nucleico polimerasa durante la amplificación por PCR. Tanto el resto indicador (por ejemplo, tinte fluorescente) en la porción de marca como el resto extintor en el oligonucleótido de extinción se pueden localizar en el extremo 5', el extremo 3' o en cualquier posición entre los extremos 5' y 3' pero se deben localizar en proximidad entre sí cuando la porción de marca se hibrida al oligonucleótido de extinción para permitir que el resto de extinción extinga la señal detectable del resto indicador.
- 20
- 25

Con respecto a diferentes porciones de marca que se hibridan a sus respectivas moléculas oligonucleotídicas de extinción a diversas temperaturas Tf, se pueden introducir nucleótidos modificados en todas o algunas posiciones en cualquiera de las porciones de marca, en los oligonucleótidos de extinción o tanto en las porciones de marca como en los oligonucleótidos de extinción de modo que se pueda acortar la longitud de los oligonucleótidos. Los ejemplos de modificaciones de nucleótidos que sirven para incrementar la temperatura de fusión incluyen LNA, PNA, G-Clamp (9-(aminoetoxi)-fenoxacina-2'-desoxicitidina), propinildesoxyuridina (pdU), propinildesoxicitidina (pdC) y diversas modificaciones en 2' en el grupo glucídico, tales como modificaciones de 2'-O-metilo. Otro tipo de modificación que puede servir para evitar la unión no deseada de la ácido nucleico polimerasa a la porción de marca o al oligonucleótido de extinción incluiría el uso de la forma L enantiomérica de un nucleótido, tal como L-ADN, L-ARN o L-LNA.

30 En otro modo de realización, la porción de marca de la sonda oligonucleotídica y la molécula de extinción están compuestas de moléculas no nucleotídicas que interactúan de forma reversible entre sí de manera dependiente de la temperatura. Los ejemplos de dichas interacciones no nucleotídicas incluyen pero no se limitan a interacciones proteína-proteína, interacciones proteína-peptido (por ejemplo, aptámeros peptídicos), interacciones proteína-molécula pequeña, interacciones péptido-molécula pequeña, interacciones molécula pequeña-molécula pequeña. En un ejemplo, la interacción bien conocida entre biotina y avidina (o estreptavidina) se puede aprovechar modificando el resto de biotina (por ejemplo, destiobiotina) o el resto de avidina (véase, Nordlund *et al.*, J. Biol. Chem., 2003, 278 (4) 2479-2483) o bien ambos para hacer la interacción reversible y dependiente de la temperatura.

35

40 Aún en otro modo de realización, la interacción entre la porción de marca y la molécula de extinción puede implicar la interacción entre una secuencia de nucleótidos (o secuencias de nucleótidos) y una molécula no nucleotídica de manera específica de secuencia. Los ejemplos de estos tipos de interacciones incluyen pero no se limitan a aptámeros de ácido nucleico, proteínas o péptidos de unión a ADN y ligandos del surco menor de ADN. El diseño y la síntesis de moléculas de unión a ADN específicas de secuencia se han descrito en varios artículos (véanse, por ejemplo, Dervan, Science, 1986, 232, 464-471; White *et al.*, Nature, 1998, 391, 468-471) y estos procedimientos se pueden usar para generar interacciones entre la porción de marca y la molécula de extinción que son dependientes de la temperatura. De forma similar, las interacciones entre nucleótidos bicatenarios y extintores solubles también se pueden explorar de modo que el resto extintor no necesita estar contenido dentro de la propia molécula de extinción sino que puede estar en una forma soluble que interactuará con y extinguirá el resto indicador solo cuando la porción de marca se une a la molécula de extinción. Los modos de realización de la presente invención se describirán además en los siguientes ejemplos, que no limitan el alcance de la invención descrita en las reivindicaciones.

45

50

55

60

### Ejemplos

#### Ejemplo 1 Verificación de extinción por el oligonucleótido de extinción

65 Se realizó un experimento para verificar que un oligonucleótido de extinción que contenía un resto extintor se podía

hibridar a la porción de marca marcada de forma fluorescente de una sonda oligonucleotídica y extinguir la señal fluorescente a una temperatura por debajo de la temperatura de fusión del dúplex pero no a una temperatura por encima de la temperatura de fusión en la que se ha disociado el dúplex. La tabla 1 contiene las secuencias de nucleótidos de la porción de marca y el oligonucleótido de extinción. El oligonucleótido de extinción Q0 no contiene el extintor mientras que el oligonucleótido de extinción Q1 contiene un extintor BHQ-2 en su extremo 5'.

5

TABLA 1

Denominación	Secuencia	Modificaciones	SEQ ID NO:
9FAM9TAG	<b>CGTCGCCAGTCAGCTCCGG9F9T</b>	9= espaciador C9, F = FAM	1
Q0	<b>CCGGAGCTGACTGGCGACGp</b>	p = fosfato	2
Q1	<b>QCCGGAGCTGACTGGCGACGp</b>	p= fosfato, Q= BHQ-2	3

10 Se incubó el oligonucleótido 9FAM9 TAG sin un oligonucleótido de extinción (QX) o con el oligonucleótido de extinción Q0 o Q1 en una proporción molar 1:5. A continuación, se ciclaron las mezclas en reacciones de 50 µl que consistían en tricina 60 mM, acetato de potasio 120 mM, DMSO al 5,4 %, acida de sodio al 0,027 %, glicerol al 3 %, Tween 20 al 0,02 %, EDTA 43,9 uM, UNG 0,2 U/ul, 19TAGC9FAMC9 0,1 uM, Q0 o Q1 0,5 uM, dATP 400 µM, 4CTP 400 µM, dGTP 400 µM, dUTP 800 µM y acetato de manganeso 3,3 mM. Las condiciones de ciclo que se asemejan a una reacción de amplificación por PCR típica se muestran en la tabla 2.

15

TABLA 2

Etapa	Descripción	N.º de ciclo	Temperatura (°C)	Tiempo	Adquisición de datos
1	Esterilización/RT	1	50	2 min	ninguna
			94	5 s	ninguna
			55	2 min	ninguna
			60	6 min	ninguna
			65	4 min	ninguna
2	Ciclos oscuros (sin adquisición de datos)	5	95	5 s	ninguna
			55	30 s	ninguna
3	Ciclos TaqMan	55	91	5 s	ninguna
			58	25 s	lectura de fluorescencia
			80	5 s	lectura de fluorescencia

20 Los resultados del experimento se muestran en la FIG. 6. Cuando se midió la señal del tinte FAM a 58 °C, se detectó fluorescencia sin oligonucleótido de extinción (QX) o con un oligonucleótido de extinción sin resto de extinción (Q0) pero no se detectó señal en ninguno de los ciclos en presencia del oligonucleótido de extinción Q1. Por el contrario, cuando se midió la fluorescencia a 80 °C, se pudieron detectar señales en todos los ciclos incluso en presencia del oligonucleótido de extinción Q1, lo que demuestra que a la temperatura mayor, el oligonucleótido de extinción Q1 ya no se hibridó con TAG, y no se observó extinción.

25

#### Ejemplo 2 PCR ultrarrápida con sonda marcada y oligonucleótido de extinción

30 Se llevó a cabo un estudio de PCR ultrarrápida usando muestras que contenían diversas concentraciones de un molde de control interno (GIC) mezclada con diversas concentraciones de una secuencia de molde del grupo M de VIH-1 (HIM). Se usó una sonda de hidrólisis TaqMan® estándar (G0) que se hibrida a la secuencia de GIC y una sonda marcada (L24) con un oligonucleótido de extinción complementario (Q9) y una porción de hibridación que se hibrida a la secuencia de HIM para detectar los productos de amplificación generados a partir de estos dos moldes. Ambas sondas se marcaron con FAM y la tabla 3 muestra sus secuencias y la secuencia del oligonucleótido de extinción.

35

TABLA 3

Denominación	Secuencia	Modificaciones	SEQ ID NO:
G0	<b>FTGCGCGTCCGQTTTGATACTTCGTAAC GGTGCp</b>	F = FAM, Q= BHQ-2, p= fosfato	4
L24	<b>QTCTCTAGCAGTGGCGCCGAACAGGGAC FCACACATTGGCACCGCCGTCTp</b>	F= FAM, Q= BHQ-2, p = fosfato, <i>tag subrayada</i>	5

Q9	AGACGGCGGTGCCAATGTGTGQp	Q = BHQ-2, p= fosfato	6
----	-------------------------	-----------------------	---

Cuatro concentraciones de GIC: se mezclaron 0 copias/reacción (cop./reac.), 100 cop./reac., 1000 cop./reac. y 10.000 cop./reac. con cuatro concentraciones de HIM: 0 cop./reac., 10 cop./reac., 100 cop./reac. y 1000 cop./reac. para formar diecisésis combinaciones de concentración diferentes. Los reactivos de PCR y las condiciones del ciclo fueron como se describe en el ejemplo 1 y la tabla 2 con la excepción de que en las reacciones se usaron 100 nM de las sondas G0 y L24 y 200 nM del oligonucleótido de extinción Q9. Se tomaron lecturas de fluorescencia del marcador FAM a 58 °C y a 80 °C para cada ciclo comenzando a partir del ciclo n.º 6 (véase la tabla 2).

Los resultados de estos experimentos se muestran en las FIGS. 7-9. Las lecturas de fluorescencia a 58 °C se muestran como curvas de crecimiento en la FIG. 7. La FIG. 7A muestra las curvas de crecimiento generadas sin HIM presente y con 0, 100, 1000 o 10.000 cop./reac. de GIC. De forma interesante, esencialmente no existen diferencias en las intensidades de fluorescencia y los valores de umbral de ciclo (Ct) en las lecturas de curva de crecimiento a 58 °C en presencia de HIM a 10 cop./reac. (FIG. 7B), 100 cop./reac. (FIG. 7C) y 1000 cop./reac. (FIG. 7D) que indican que solo se detecta la señal de FAM de la sonda TaqMan® estándar G0 a esta temperatura. Esto se debe a que el marcador FAM en la sonda marcada L24 se extingue muy eficazmente por el extintor en el oligonucleótido de extinción Q9 y no interfiere con la detección de la diana GIC.

Las lecturas de fluorescencia a 80 °C se muestran como curvas de crecimiento en la FIG. 8. La FIG. 8A muestra las curvas de crecimiento generadas sin GIC presente y con 0, 10, 100 o 1000 cop./reac. de HIM. Ahora se puede detectar la fluorescencia del marcador FAM en la sonda L24 porque ya no se extingue tanto por el extintor en la "porción de hibridación" de la sonda (debido a la hidrólisis por la nucleasa) como por el extintor en el oligonucleótido de extinción (Q9) debido a la disociación de la hebra a esta alta temperatura. Aunque la intensidad de fluorescencia de la sonda L24 es considerablemente menor que la de la sonda G0, todavía es suficiente para calcular los valores de Ct que corresponden a las concentraciones de partida de HIM. Sin embargo, cuando tanto HIM como GIC están presentes, las lecturas de fluorescencia a 80 °C generan curvas complejas debido a la fluorescencia más intensa que se detecta de la sonda G0 (véanse las FIGS. 8B, 8C, 8D). Por lo tanto, para "descubrir" la señal fluorescente de la sonda marcada L24, sería necesario restar la señal fluorescente de la sonda G0, lo que implicaría restar las lecturas de fluorescencia a 58 °C (que solo se aporta por la sonda G0) a partir de las lecturas de fluorescencia a 80 °C y derivar curvas de crecimiento que se parecerían a las observadas en la FIG. 8A.

Cuando se restó el 100 % de las lecturas de fluorescencia a 58 °C de las lecturas de fluorescencia a 80 °C, las curvas de crecimiento derivadas mostraron valores negativos que indicaban que había una sobrecompensación de la sustracción. El motivo de esta observación se debió a la intensidad de fluorescencia reducida del marcador FAM a 80 °C en comparación con la intensidad a 58 °C. Por lo tanto, se consideró necesario un coeficiente de "normalización" y a continuación se determinó empíricamente que un 84 % de las señales a 58 °C restadas de las señales a 80 °C generaron los mejores resultados. Las curvas de crecimiento derivadas se muestran en la FIG. 9A, 9B, 9C y 9D y todas son prácticamente idénticas a las curvas de crecimiento de GIC 0 de la FIG. 8A. Estos resultados muestran que las señales fluorescentes que indican la presencia de GIC se pueden separar de las señales fluorescentes que indican la presencia de HIM y demuestran la utilidad de multiplexación de la presente invención.

#### Ejemplo 3: PCR ultrarrápida con sondas que tienen diferentes tintes fluorescentes

Se realizó una serie de experimentos como se describe en el ejemplo 2, excepto que las sondas G0 y L24 se marcaron con tinte FAM en el primer conjunto, con tinte HEX en el segundo conjunto, con tinte JA270 en el tercer conjunto y con tinte Cy5.5 en el cuarto conjunto. En cada conjunto de experimentos, se realizó la amplificación por PCR solo con el molde de GIC presente a 100 cop./reac., solo con el molde de VIH presente a 1000 cop./reac. o tanto con los moldes de GIC (100 cop./reac.) como de VIH (1000 cop./reac.) presentes. Los resultados del experimento se muestran en la FIG. 10. En las lecturas de fluorescencia a 58 °C (FIG. 10, 1.ª columna), solo se observaron las señales generadas por las sondas G0 para los moldes de GIC, como era de esperar, puesto que las sondas L24 todavía estaban hibridadas a los oligonucleótidos de extinción Q9. En las lecturas de fluorescencia a 80 °C (FIG. 10, 2.ª columna), se observaron las señales generadas tanto por las sondas G0 (para GIC) como por las sondas L24 "no extinguidas" (para VIH). Después de usar un coeficiente normalizado para cada tinte fluorescente, las señales a 58 °C restadas de las señales a 80 °C generaron las curvas de crecimiento derivadas solo del molde de VIH (FIG. 10, 3.ª columna). Las señales generadas de HEX y JA270 fueron similares o mayores que las señales de FAM, mientras que las señales de Cy5.5 fueron considerablemente menores que las señales de FAM pero, no obstante, detectables.

#### Ejemplo 4: PCR ultrarrápida con sonda marcada con L-ADN y oligonucleótido de extinción

Se realizó un experimento idéntico al experimento descrito en el ejemplo 2 con la excepción de que la sonda marcada L24 para detectar el molde de grupo M de VIH-1 (HIM) estaba compuesta en su totalidad de nucleótidos de L-desoxirribosa en lugar de los nucleótidos de D-desoxirribosa "naturales". Los resultados del experimento se muestran en la FIG. 11 donde se observó que las señales de fluorescencia generadas usando la forma de

enantiómero L de la sonda marcada L24 eran 4-5 veces mayores que las señales generadas usando la forma de enantiómero D de la sonda marcada L24.

**Ejemplo 5: PCR ultrarrápida con sondas marcadas y oligonucleótidos de extinción que tienen modificaciones de 2'-O-metilo**

Se realizó un experimento similar al descrito en el ejemplo 2 excepto que se usaron sondas marcadas y oligonucleótidos de extinción que tenían modificaciones de nucleótidos. Además de la sonda L24 "estándar" usada para detectar la presencia del molde de HIM, se generó la sonda marcada, L24-OME en la que cada nucleótido en la porción de marca de la sonda (mostrada en la TABLA 3 como la porción subrayada de L24) se modificó al tener un sustituyente O-metilo en la posición 2' del resto de ribosa (2'-OMe). También se generaron dos oligonucleótidos de extinción Q9 modificados para hibridarse a la porción de marca de L24. Q9-OME tenía todos los nucleótidos modificados por un sustituyente 2'-OMe, y Q9-OME (A/G) tenía solo los nucleótidos A y G modificados por un sustituyente 2'-OMe. La detección del molde de HIM se realizó usando tres combinaciones diferentes de la porción de marca y el oligonucleótido de extinción: L24 con Q9-OME (A/G), L24-OME con Q9-OME (A/G) y L24-OME con Q9-OME. Los resultados de este experimento se muestran en la FIG. 12.

Como era de esperar, a 58 °C, solo se pudo detectar la señal fluorescente de la sonda TaqMan® G0. A 75 °C, se detectaron señales fluorescentes de G0 y de L24/Q9-OME (A/G), pero no de las otras dos combinaciones de oligonucleótidos de extinción de marca. A 88 °C, también se pudieron detectar señales fluorescentes de L24-OME/Q9-OME (A/G) y a 97 °C se detectaron señales de todas las sondas, incluida la combinación L24-OME/Q9-OME. Estos resultados demuestran no solo que se pueden lograr lecturas fluorescentes de tres temperaturas separadas usando sondas marcadas y moléculas de extinción, sino que también se pueden introducir selectivamente modificaciones de nucleótidos tales como 2'-OMe en la secuencia de nucleótidos de la porción marca o en el oligonucleótido de extinción o en ambos para alterar la temperatura de fusión del dúplex marca-oligonucleótido de extinción sin tener que cambiar ni sus secuencias ni sus longitudes.

**Listado de secuencias informal**

SEQ ID NO: 1: secuencia oligonucleotídica de 9FAM9TAG

CGTCGCCAGTCAGCTCCGGT

SEQ ID NO: 2: secuencia de oligonucleótido de extinción Q0 (sin extintor)

CCGGAGCTGACTGGCGACG

SEQ ID NO: 3: secuencia de oligonucleótido de extinción Q1 (extintor BHQ-1 en extremo 5')

CCGGAGCTGACTGGCGACG

SEQ ID NO: 4: secuencia oligonucleotídica de sonda TaqMan GO (FAM/BHQ/fosfato)

TGCGCGTCCC GTTTGATACTTCGTAACGGTG

SEQ ID NO: 5: secuencia oligonucleotídica de sonda marcada L24 (BHQ/FAM/fosfato)

TCTCTAGCAGTGGCGCCGAACAGGGACCACACATTGGCACCGCCGTCT

SEQ ID NO: 6: secuencia de oligonucleótido de extinción Q9 (extintor en el extremo 3')

AGACGGCGGTGCCAATGTGTG

## **LISTADO DE SECUENCIAS**

	<110>	Roche Diagnostics GmbH F. Hoffmann-La Roche AG Roche Molecular Systems, Inc.
5	<120>	Procedimientos para realizar PCR ultrarrápida multiplexada
10	<130>	P33677-WO-KOE
	<150>	62/395.325
	<151>	15/09/2016
15	<150>	62/435.595
	<151>	16/12/2016
	<150>	62/536.871
	<151>	25/07/2017
20	<160>	6
	<170>	PatentIn versión 3.5
25	<210>	1
	<211>	20
	<212>	ADN
	<213>	Secuencia artificial
30	<220>	
	<223>	Secuencia oligonucleotídica de 9FAM9TAG
	<400>	1
35	<b>cgtcgccagt cagctccggt</b>	
	<210>	2
	<211>	19
	<212>	ADN
40	<213>	Secuencia artificial
	<220>	
	<223>	Oligonucleótido de extinción Q0
45	<400>	2
	<b>ccggagctga ctggcgacg</b>	
50	<210>	3
	<211>	19
	<212>	ADN
	<213>	Secuencia artificial
55	<220>	
	<223>	Oligonucleótido de extinción Q1 (BHQ-1 en extremo 5')
	<400>	3
	<b>ccggagctga ctggcgacg</b>	
60	<210>	4
	<211>	33
	<212>	ADN
	<213>	Secuencia artificial
65	<220>	
	<223>	Oligonucleótido de sonda TaqMan G0

ES 2 933 176 T3

<400> 4

tgcgcgtccc gtttgatac ttcgtaacgg tgc 33

5 <210> 5  
<211> 49  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

10 <220>  
<223> Oligonucleótido de sonda marcada L24

<400> 5  
tctctagcag tggcgccgga acagggacca cacattggca ccggcggtct 49

15 <210> 6  
<211> 21  
<212> ADN  
20 <213> Secuencia artificial

<220>  
<223> Oligonucleótido de extinción Q9

25 <400> 6  
agacggcggt gccaatgtgt g 21

## REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para la amplificación y detección de un ácido nucleico diana en una muestra que comprende las etapas de:
- (a) poner en contacto dicha muestra que contiene dicho ácido nucleico diana en un recipiente de reacción individual con
- (i) un par de cebadores oligonucleotídicos, pudiendo cada cebador oligonucleotídico hibridarse a hebras opuestas de una subsecuencia de dicho ácido nucleico diana;
- (ii) una sonda oligonucleotídica que comprende una porción de hibridación y una porción de marca, en la que la porción de marca comprende una secuencia de nucleótidos no complementaria a la secuencia de ácido nucleico diana o una molécula no nucleotídica, en la que la porción de hibridación comprende una secuencia de nucleótidos al menos parcialmente complementaria a la secuencia de ácido nucleico diana y se hibrida a una región de dicha subsecuencia de dicho ácido nucleico diana que se une por dicho par de cebadores oligonucleotídicos, en la que dicha sonda oligonucleotídica comprende además un marcador doble interactivo que comprende un resto indicador localizado en dicha porción de marca o en dicha porción de hibridación y un primer resto extintor localizado en dicha porción de hibridación y en la que dicho resto indicador se separa de dicho primer resto extintor por un sitio de escisión susceptible a nucleasa; y en la que dicha porción de marca se une de forma reversible de manera dependiente de la temperatura a un oligonucleótido de extinción que comprende o se asocia con uno o más restos extintores que pueden extinguir dicho resto indicador cuando dicho oligonucleótido de extinción se une a dicha porción de marca;
- (b) amplificar dicho ácido nucleico diana por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) usando una ácido nucleico polimerasa que tiene actividad nucleasa 5' a 3' de modo que durante una etapa de extensión de cada ciclo de PCR, la actividad nucleasa 5' a 3' de la polimerasa permite la escisión y la separación de la porción de marca del primer resto extintor en la porción de hibridación de la sonda oligonucleotídica;
- (c) medir una señal suprimida del resto indicador a una primera temperatura a la que el oligonucleótido de extinción se une a la porción de marca;
- (d) incrementar la temperatura hasta una segunda temperatura a la que el oligonucleótido de extinción no se une a la porción de marca;
- (e) medir una señal corregida por temperatura del resto indicador a la segunda temperatura;
- (f) obtener un valor de señal calculado restando la señal suprimida detectada a la primera temperatura de la señal corregida por temperatura detectada a la segunda temperatura;
- (g) repetir las etapas de (b) a (f) a través de múltiples ciclos de PCR;
- (h) medir los valores de señal calculados de los múltiples ciclos de PCR para detectar la presencia del ácido nucleico diana.
2. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que el resto indicador está en la porción de marca de la sonda oligonucleotídica.
3. El procedimiento de las reivindicaciones 1 o 2, en el que la porción de marca comprende una secuencia de nucleótidos no complementaria a la secuencia de ácido nucleico diana y el oligonucleótido de extinción comprende una secuencia de nucleótidos al menos parcialmente complementaria a la porción de marca de la sonda oligonucleotídica y se une a la porción de marca por hibridación.
4. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 1 - 3, en el que la porción de marca comprende una modificación de modo que no se puede extender por una ácido nucleico polimerasa.
5. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 1 - 4, en el que la porción de marca de la sonda oligonucleotídica o el oligonucleótido de extinción o tanto la porción de marca como el oligonucleótido de extinción contienen una o más modificaciones de nucleótidos y en el que la una o más modificaciones de nucleótidos se selecciona del grupo que consiste en ácido nucleico bloqueado (LNA), ácido peptidonucleico (PNA), ácido nucleico con puente (BNA), sustitución de 2'-O-alquilo, nucleótido L-enantiomérico o combinaciones de los mismos.
6. Un procedimiento para detectar dos o más secuencias de ácido nucleico diana en una muestra que comprende las etapas de:
- (a) poner en contacto dicha muestra que se sospecha que contiene dichas dos o más secuencias de ácido

nucleico diana en un recipiente de reacción individual con

(i) un primer par de cebadores oligonucleotídicos con secuencias de nucleótidos que son complementarias a cada hebra de una primera secuencia de ácido nucleico diana, y un segundo par de cebadores oligonucleotídicos con secuencias de nucleótidos que son complementarias a cada hebra de una segunda secuencia de ácido nucleico diana;

(ii) una primera sonda oligonucleotídica que comprende una secuencia de nucleótidos al menos parcialmente complementaria a la primera secuencia de ácido nucleico diana y que se hibrida dentro de una región de la primera secuencia de ácido nucleico diana que se une por el primer par de cebadores oligonucleotídicos, en la que dicha primera sonda oligonucleotídica comprende un resto fluorescente que puede generar una señal detectable y un primer resto extintor que puede extinguir la señal detectable generada por el resto fluorescente, en la que dicho resto fluorescente se separa del primer resto extintor por un sitio de escisión susceptible a nucleasa;

(iii) una segunda sonda oligonucleotídica que comprende dos porciones distintas:

- una porción de hibridación que comprende una secuencia de nucleótidos al menos parcialmente complementaria a la segunda secuencia de ácido nucleico diana y que se hibrida dentro de una región de la segunda secuencia de ácido nucleico diana que se une por el segundo par de cebadores oligonucleotídicos, en la que la porción de hibridación comprende un segundo resto extintor; y

- una porción de marca fijada al extremo 5' o al extremo 3' de la porción de hibridación o fijada por medio de un conector a una región de la porción de hibridación que comprende una secuencia de nucleótidos que no es complementaria a las dos o más secuencias de ácido nucleico diana, en la que la porción de marca comprende un resto fluorescente que es idéntico al resto fluorescente en la primera sonda oligonucleotídica y con una señal detectable que se puede extinguir por el segundo resto extintor en la porción de hibridación, en la que dicho resto fluorescente se separa del segundo resto extintor por un sitio de escisión susceptible a nucleasa;

(iv) un oligonucleótido de extinción que comprende una secuencia de nucleótidos al menos parcialmente complementaria a la porción de marca de la segunda sonda oligonucleotídica y que se hibrida a la porción de marca para formar un dúplex, en el que dicho oligonucleótido de extinción comprende un tercer resto extintor que extingue la señal detectable generada por la fracción fluorescente en la porción de marca cuando el oligonucleótido de extinción se hibrida a la porción de marca;

(b) amplificar las primera y segunda secuencias de ácido nucleico diana por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) usando una ácido nucleico polimerasa que tiene actividad nucleasa 5' a 3' de modo que durante una etapa de extensión de cada ciclo de PCR, la actividad nucleasa 5' a 3' de la ácido nucleico polimerasa permite

(i) la escisión y la separación del resto fluorescente del primer resto extintor en la primera sonda oligonucleotídica, y

(ii) la escisión y la separación del resto fluorescente en la porción de marca del segundo resto extintor en la porción de hibridación de la segunda sonda oligonucleotídica, en el que en la etapa de extensión el oligonucleótido de extinción permanece hibridado a la porción de marca;

(c) medir una señal fluorescente a una primera temperatura a la que el oligonucleótido de extinción se hibrida a la porción de marca de la segunda sonda oligonucleotídica;

(d) incrementar la temperatura hasta una segunda temperatura, que es mayor que la primera temperatura, a la que el oligonucleótido de extinción no se hibrida a la porción de marca de la segunda sonda oligonucleotídica;

(e) medir una señal fluorescente a la segunda temperatura;

(f) obtener un valor de señal calculado restando la señal fluorescente detectada a la primera temperatura de la señal fluorescente detectada a la segunda temperatura;

(g) repetir las etapas de (b) a (f) en múltiples ciclos de PCR para producir la cantidad deseada de productos de amplificación a partir de las primera y segunda secuencias de ácido nucleico diana;

(h) determinar la presencia de la primera secuencia de ácido nucleico diana a partir de las señales fluorescentes detectadas a la primera temperatura de los múltiples ciclos de PCR y la presencia de la segunda secuencia de ácido nucleico diana a partir de los valores de señal calculados de los múltiples ciclos de PCR.

7. El procedimiento de la reivindicación 6, en el que la porción de marca se fija al extremo 5' de la porción de hibridación.

8. El procedimiento de las reivindicaciones 6 o 7, en el que la porción de marca comprende una modificación de modo que no se puede extender por una ácido nucleico polimerasa.
- 5 9. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 6 - 8, en el que el oligonucleótido de extinción se conecta a la porción de marca de la segunda sonda oligonucleotídica por medio de una estructura de tallo-bucle.
- 10 10. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 6 - 9, en el que la porción de marca de la segunda sonda oligonucleotídica o el oligonucleótido de extinción o tanto la porción de marca como el oligonucleótido de extinción contienen una o más modificaciones de nucleótidos y en el que la una o más modificaciones de nucleótidos se selecciona del grupo que consiste en ácido nucleico bloqueado (LNA), ácido peptidónucleico (PNA), ácido nucleico con puente (BNA), sustitución de 2'-O-alquilo, nucleótido L-enantiomérico o combinaciones de los mismos.
- 15 11. Un procedimiento para detectar dos o más secuencias de ácido nucleico diana en una muestra que comprende las etapas de:
- (a) poner en contacto dicha muestra que se sospecha que contiene dichas dos o más secuencias de ácido nucleico diana en un recipiente de reacción individual con
- 20 (i) un primer par de cebadores oligonucleotídicos con secuencias de nucleótidos que son complementarias a cada hebra de una primera secuencia de ácido nucleico diana, y un segundo par de cebadores oligonucleotídicos con secuencias de nucleótidos que son complementarias a cada hebra de una segunda secuencia de ácido nucleico diana;
- 25 (ii) una primera sonda oligonucleotídica que comprende dos porciones distintas:
- una primera porción de hibridación que comprende una secuencia de nucleótidos al menos parcialmente complementaria a la primera secuencia de ácido nucleico diana y que se hibrida dentro de una región de la primera secuencia de ácido nucleico diana que se une por el primer par de cebadores oligonucleotídicos, en la que la primera porción de hibridación comprende un primer resto extintor y se bloquea en el extremo 3' para prohibir la extensión por una ácido nucleico polimerasa; y
- 30 - una primera porción de marca fijada al extremo 5' o al extremo 3' de la primera porción de hibridación o fijada por medio de un conector a una región de la porción de hibridación que comprende una secuencia de nucleótidos que no es complementaria a las dos o más secuencias de ácido nucleico diana, en la que la primera porción de marca comprende un resto fluorescente con una señal detectable que se puede extinguir por el primer resto extintor en la primera porción de hibridación, en la que dicho resto fluorescente se separa del primer resto extintor por un sitio de escisión susceptible a nucleasa;
- 35 (iii) un primer oligonucleótido de extinción que comprende una secuencia de nucleótidos al menos parcialmente complementaria a la primera porción de marca de la primera sonda oligonucleotídica y que se hibrida a la primera porción de marca para formar un dúplex, en el que dicho primer oligonucleótido de extinción comprende un segundo resto extintor que extingue la señal detectable generada por el resto fluorescente en la primera porción de marca cuando el primer oligonucleótido de extinción se hibrida a la primera porción de marca;
- 40 (iv) una segunda sonda oligonucleotídica que comprende dos porciones distintas:
- una segunda porción de hibridación que comprende una secuencia de nucleótidos al menos parcialmente complementaria a la segunda secuencia de ácido nucleico diana y que se hibrida dentro de una región de la segunda secuencia de ácido nucleico diana que se une por el segundo par de cebadores oligonucleotídicos, en la que la segunda porción de hibridación comprende un tercer resto extintor y se bloquea en el extremo 3' para prohibir la extensión por una ácido nucleico polimerasa; y
- 45 - una segunda porción de marca fijada al extremo 5' o al extremo 3' de la segunda porción de hibridación o fijada por medio de un conector a una región de la porción de hibridación que comprende una secuencia de nucleótidos que no es complementaria a las dos o más secuencias de ácido nucleico diana y que tiene una secuencia de ácido nucleico diferente o modificaciones de nucleótidos diferentes en comparación con la secuencia de nucleótidos de la primera porción de marca de la primera sonda oligonucleotídica, en la que la segunda porción de marca comprende un resto fluorescente que es idéntico al resto fluorescente en la primera porción de marca de la primera sonda oligonucleotídica y con una señal detectable que se puede extinguir por el tercer resto extintor en la segunda porción de hibridación, en la que dicho resto fluorescente se separa del tercer resto extintor por un sitio de escisión susceptible a nucleasa;
- 50 (v) un segundo oligonucleótido de extinción que comprende una secuencia de nucleótidos al menos parcialmente complementaria a la segunda porción de marca de la segunda sonda oligonucleotídica y que se hibrida a la segunda porción de marca para formar un dúplex, en el que dicho segundo oligonucleótido de extinción comprende

un cuarto resto extintor que extingue la señal detectable generada por el resto fluorescente en la segunda porción de marca cuando el segundo oligonucleótido de extinción se hibrida a la segunda porción de marca;

5 en el que el dúplex entre el segundo oligonucleótido de extinción y la segunda porción de marca de la segunda sonda oligonucleotídica tiene un valor de temperatura de fusión ( $T_f$ ) mayor que el dúplex entre el primer oligonucleótido de extinción y la primera porción de marca de la primera sonda oligonucleotídica;

10 (b) amplificar las primera y segunda secuencias de ácido nucleico diana por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) usando una ácido nucleico polimerasa que tiene actividad nucleasa 5' a 3' de modo que durante una etapa de extensión de cada ciclo de PCR, la actividad nucleasa 5' a 3' de la ácido nucleico polimerasa permite

15 (i) la escisión y la separación del resto fluorescente en la primera porción de marca del primer resto extintor en la primera porción de hibridación de la primera sonda oligonucleotídica, en el que en la etapa de extensión el primer oligonucleótido de extinción permanece hibridado a la primera porción de marca, y

15 (ii) la escisión y la separación del resto fluorescente en la segunda porción de marca del tercer resto extintor en la segunda porción de hibridación de la segunda sonda oligonucleotídica, en el que en la etapa de extensión el segundo oligonucleótido de extinción permanece hibridado a la segunda porción de marca;

20 (c) incrementar la temperatura hasta una primera temperatura a la que el primer oligonucleótido de extinción no se hibrida a la primera porción de marca de la primera sonda oligonucleotídica y el segundo oligonucleótido de extinción permanece hibridado a la segunda porción de marca de la segunda sonda oligonucleotídica;

25 (d) medir una señal fluorescente a la primera temperatura;

(e) incrementar la temperatura hasta una segunda temperatura, que es mayor que la primera temperatura, a la que el segundo oligonucleótido de extinción no se hibrida a la segunda porción de marca de la segunda sonda oligonucleotídica;

30 (f) medir una señal fluorescente a la segunda temperatura;

(g) obtener un valor de señal calculado restando la señal fluorescente detectada a la primera temperatura de la señal fluorescente detectada a la segunda temperatura;

35 (h) repetir las etapas de (b) a (g) en múltiples ciclos de PCR para producir la cantidad deseada de productos de amplificación a partir de las primera y segunda secuencias de ácido nucleico diana;

40 (i) determinar la presencia de la primera secuencia de ácido nucleico diana a partir de las señales fluorescentes detectadas a la primera temperatura de los múltiples ciclos de PCR y la presencia de la segunda secuencia de ácido nucleico diana a partir de los valores de señal calculados de los múltiples ciclos de PCR.

45 12. El procedimiento de la reivindicación 11, en el que la primera porción de marca se fija al extremo 5' de la primera porción de hibridación de la primera sonda oligonucleotídica y la segunda porción de marca se fija al extremo 5' de la segunda porción de hibridación de la segunda sonda oligonucleotídica.

50 13. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 11 - 12, en el que el primer oligonucleótido de extinción se conecta a la primera porción de marca de la primera sonda oligonucleotídica por medio de una estructura de tallo-bucle y/o en el que el segundo oligonucleótido de extinción se conecta a la segunda porción de marca de la segunda sonda oligonucleotídica por medio de una estructura de tallo-bucle.

55 14. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 11 - 13, en el que la primera porción de marca y la segunda porción de marca comprenden ambas una modificación de modo que ambas porciones de marca no se pueden extender por una ácido nucleico polimerasa.

60 15. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 11 - 14, en el que cualquiera de la primera porción de marca de la primera sonda oligonucleotídica o el primer oligonucleótido de extinción o la segunda porción de marca de la segunda sonda oligonucleotídica o el segundo oligonucleótido de extinción o cualquier combinación de los mismos contiene una o más modificaciones de nucleótidos y en el que la una o más modificaciones de nucleótidos se selecciona del grupo que consiste en ácido nucleico bloqueado (LNA), ácido peptidonucleico (PNA), ácido nucleico con puente (BNA), sustitución de 2'-O-alquilo, nucleótido L-enantiomérico o combinaciones de los mismos.

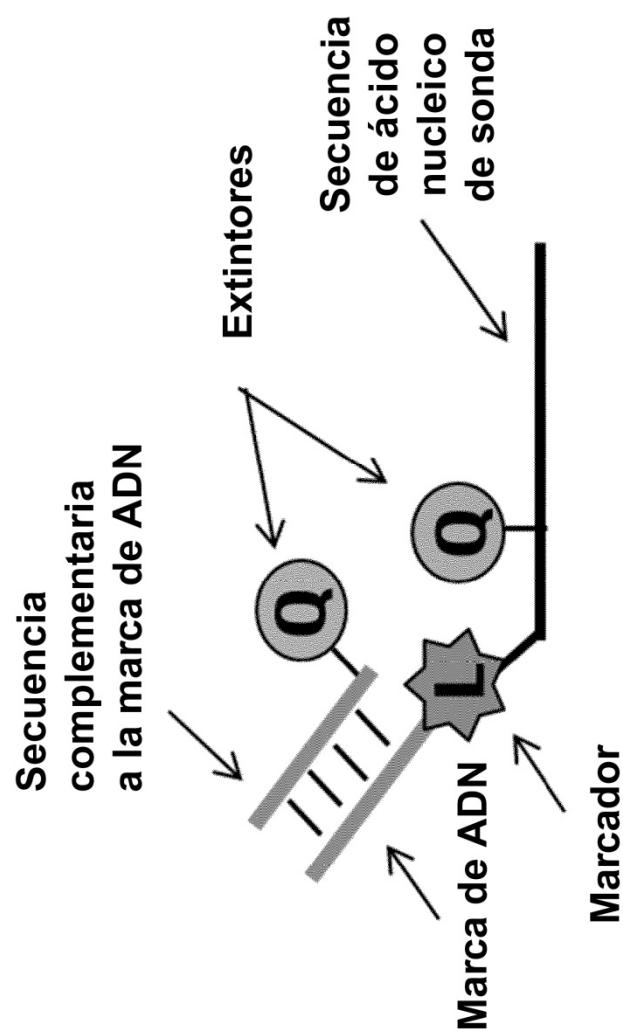


FIG. 1

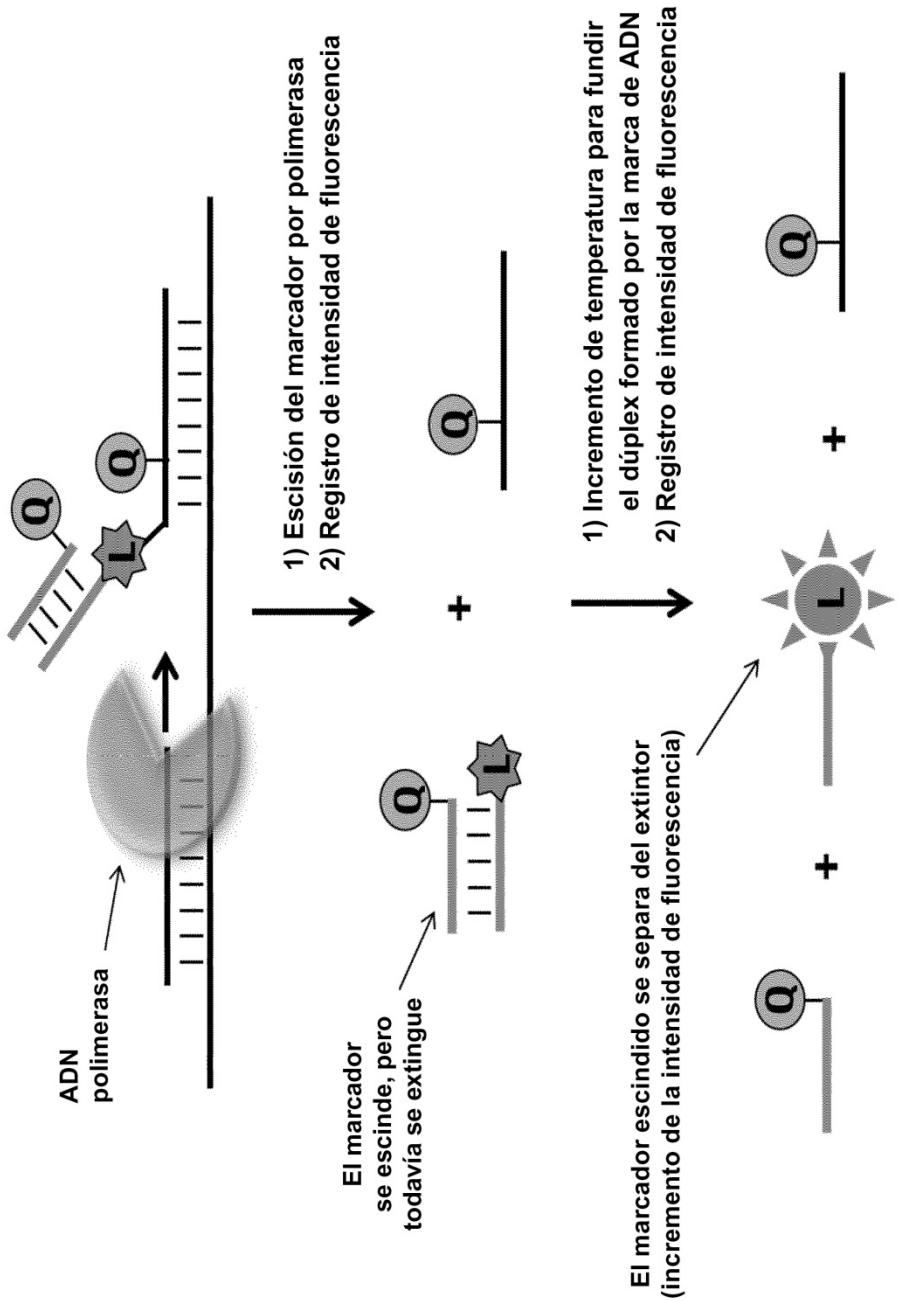
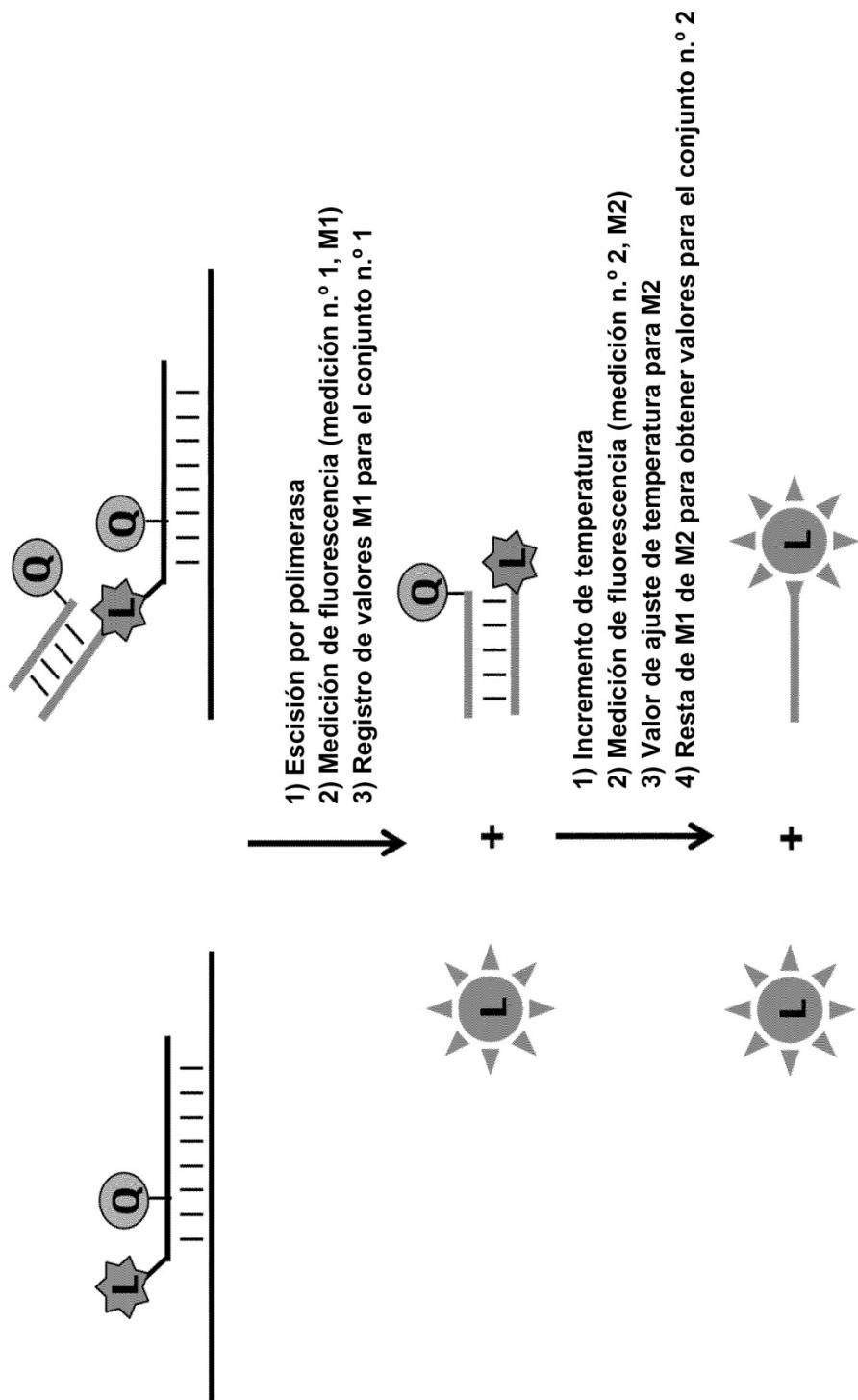


FIG. 2



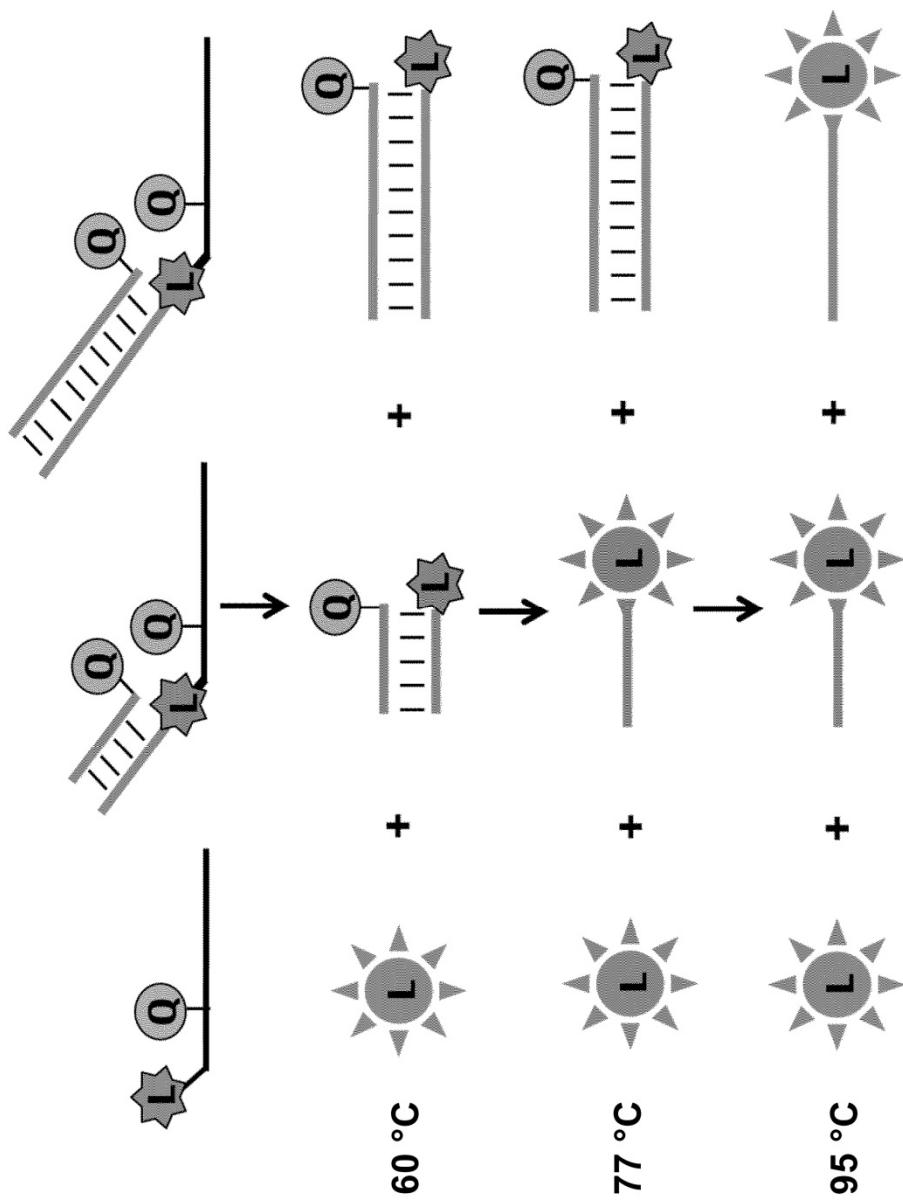
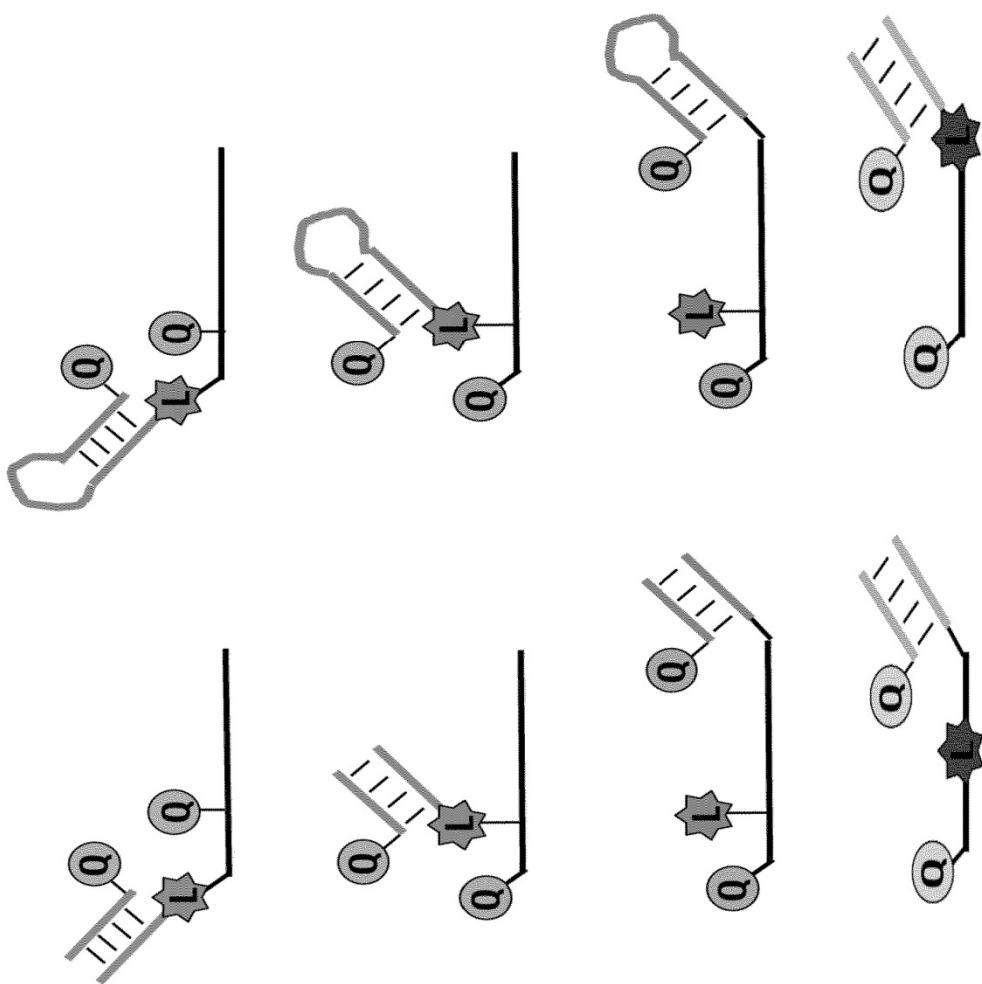
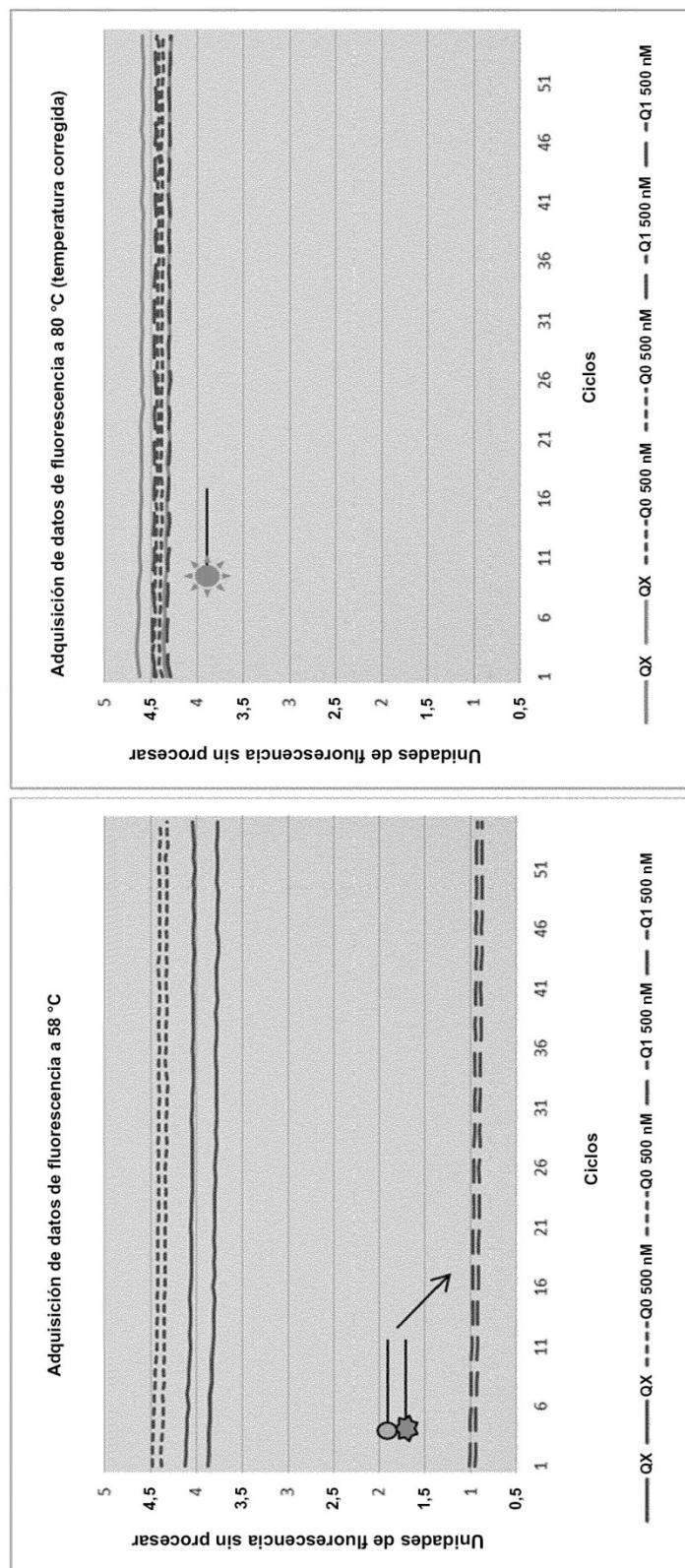
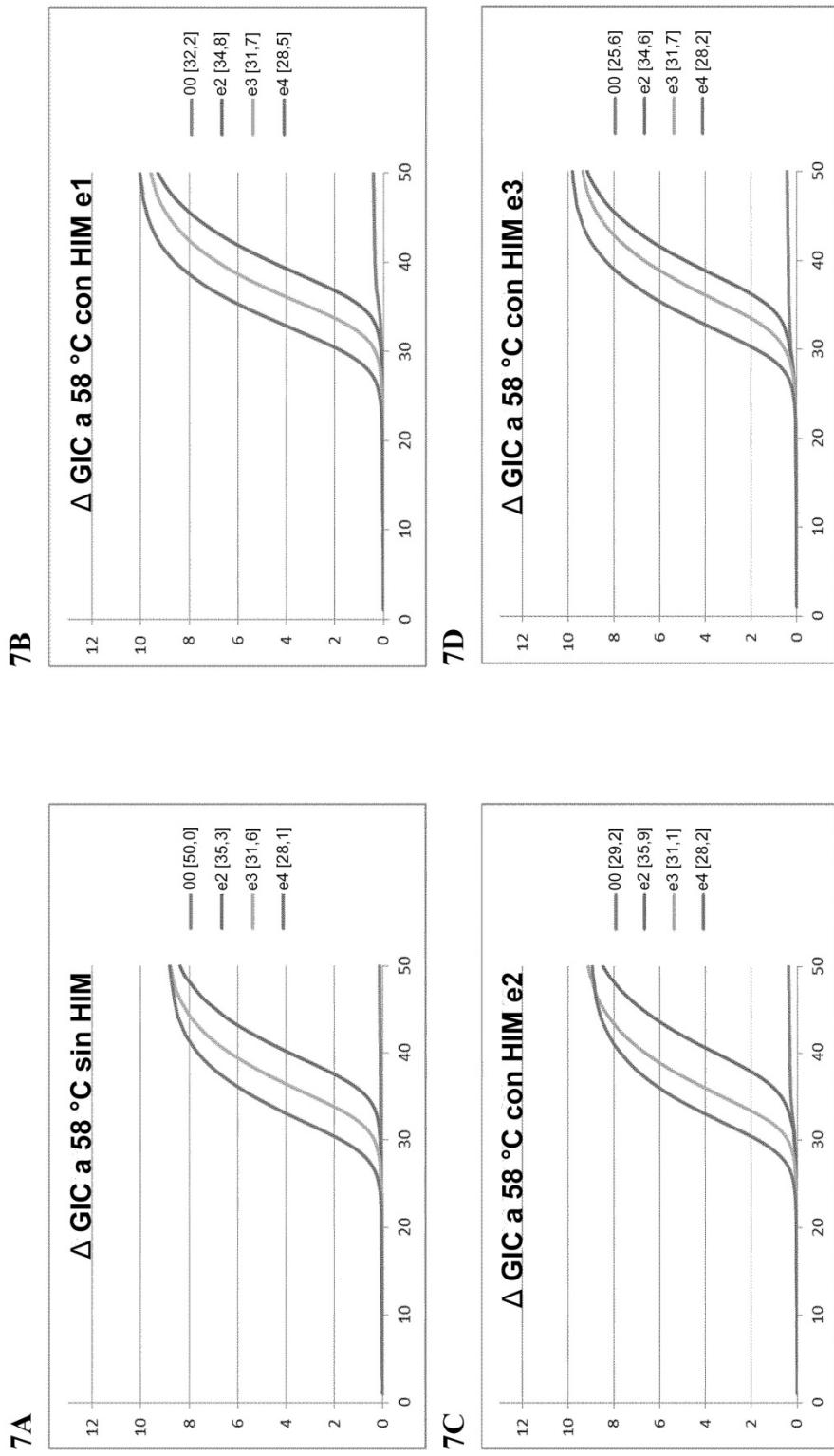


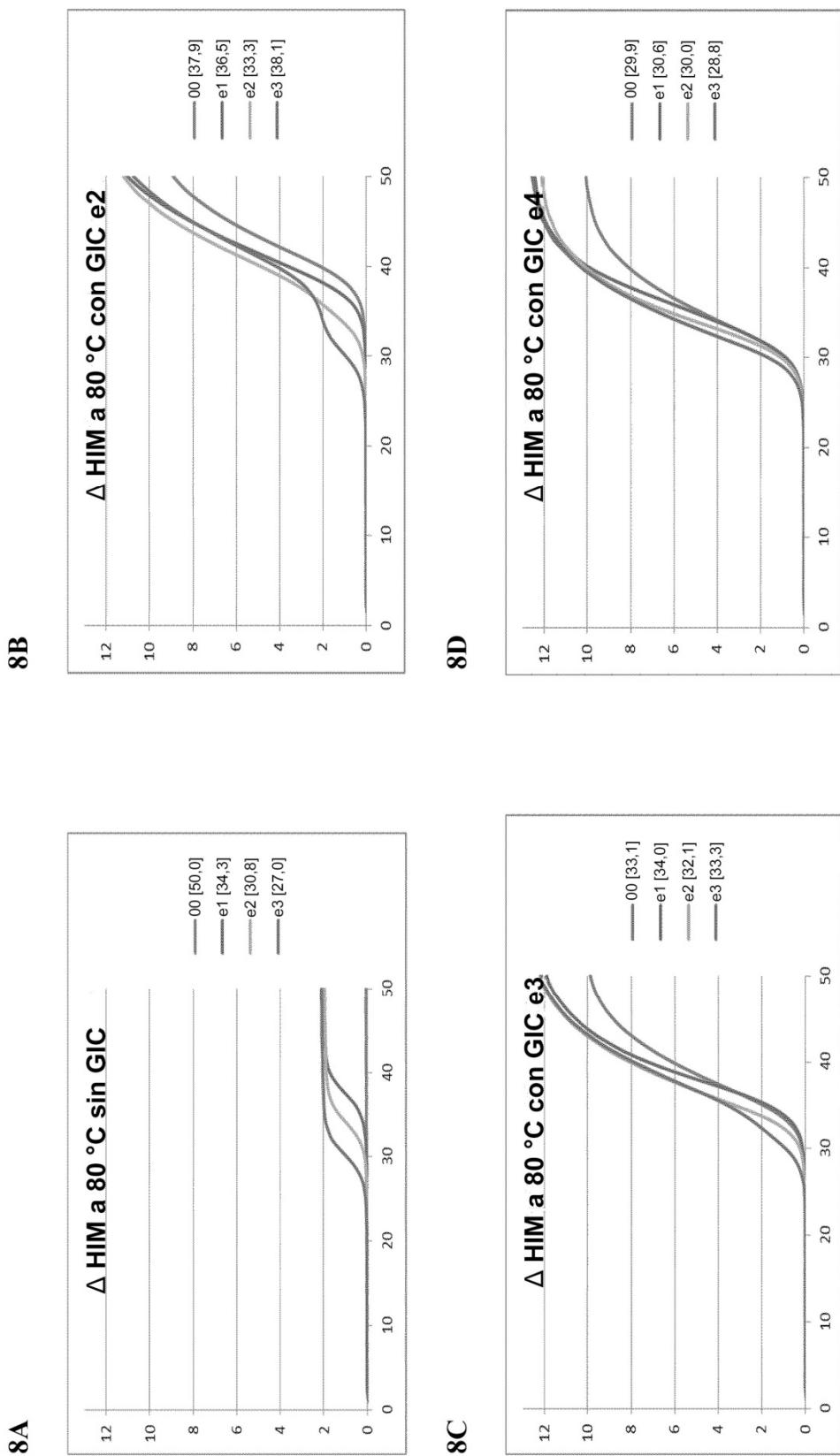
FIG. 4

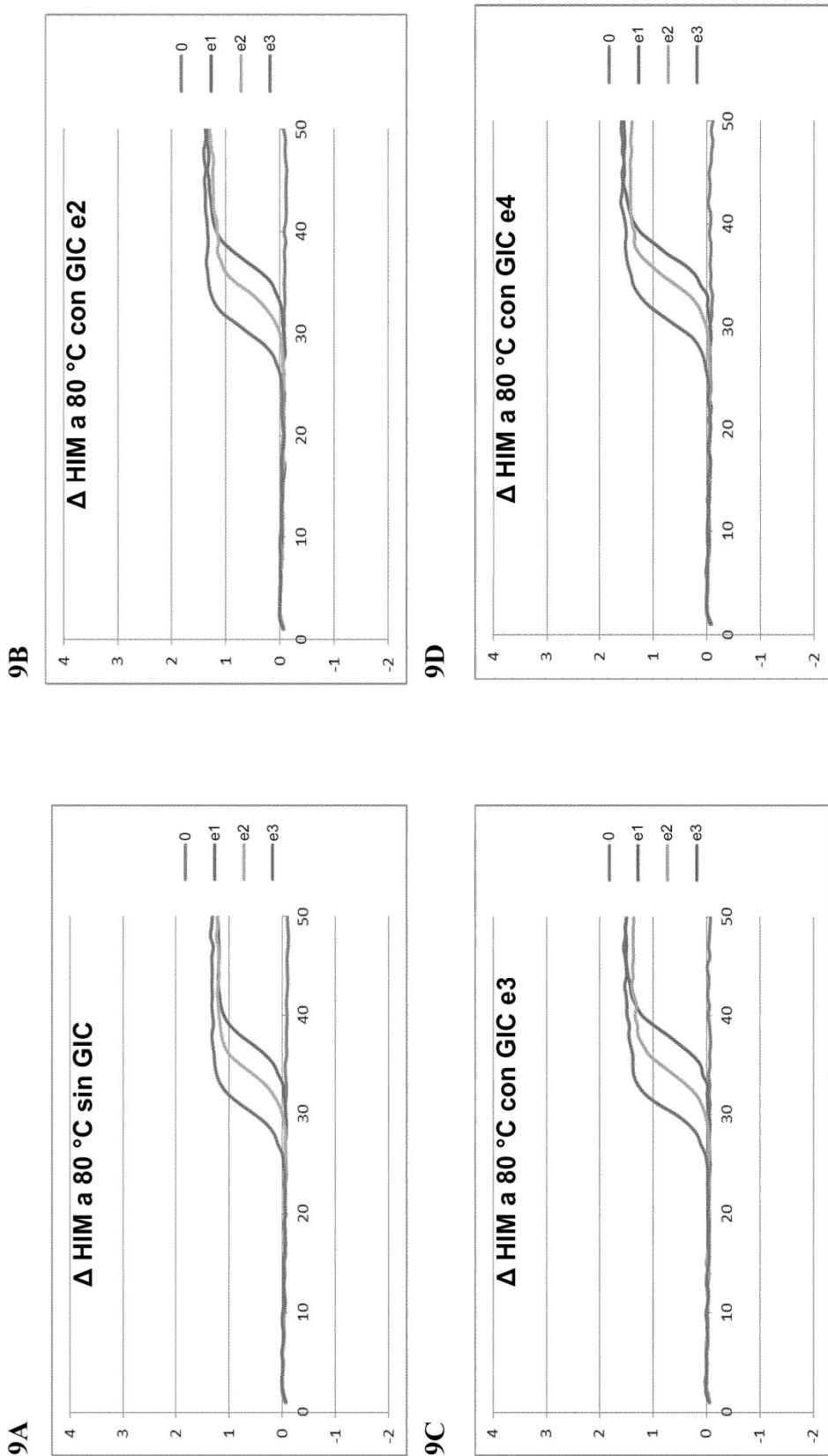
FIG. 5



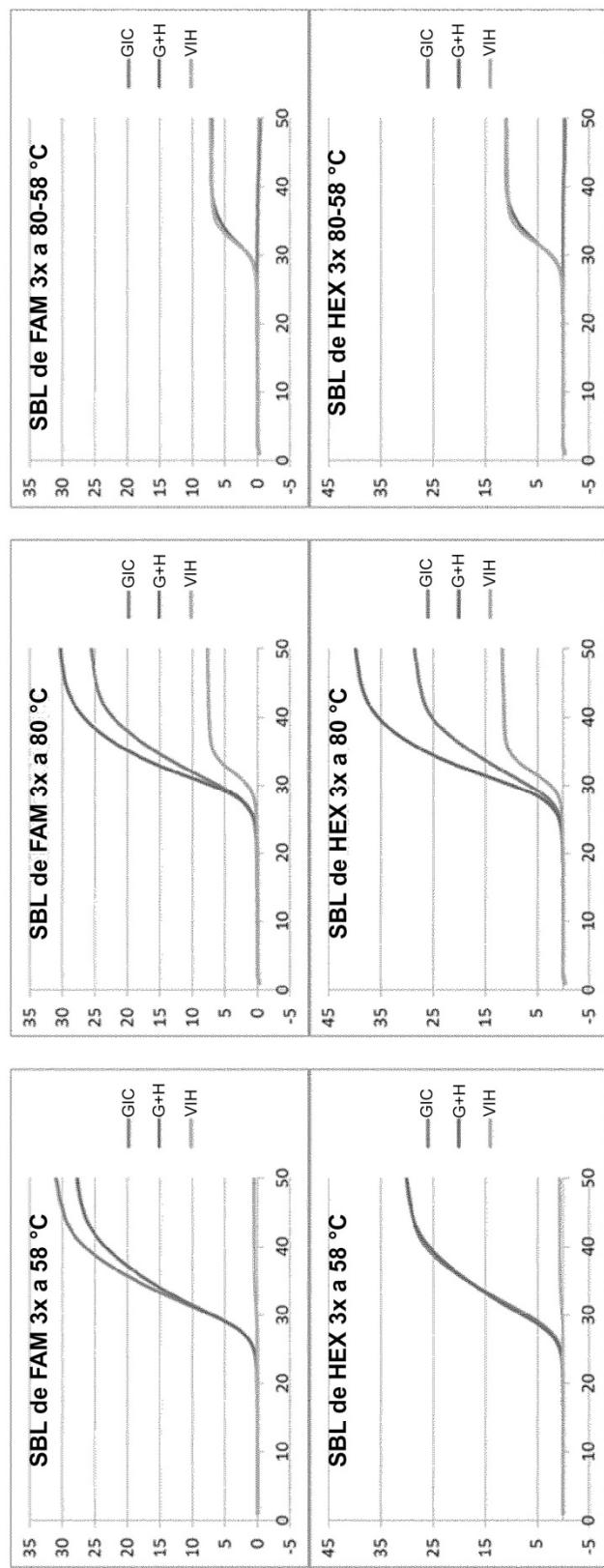
**FIG. 6**

**FIG. 7**

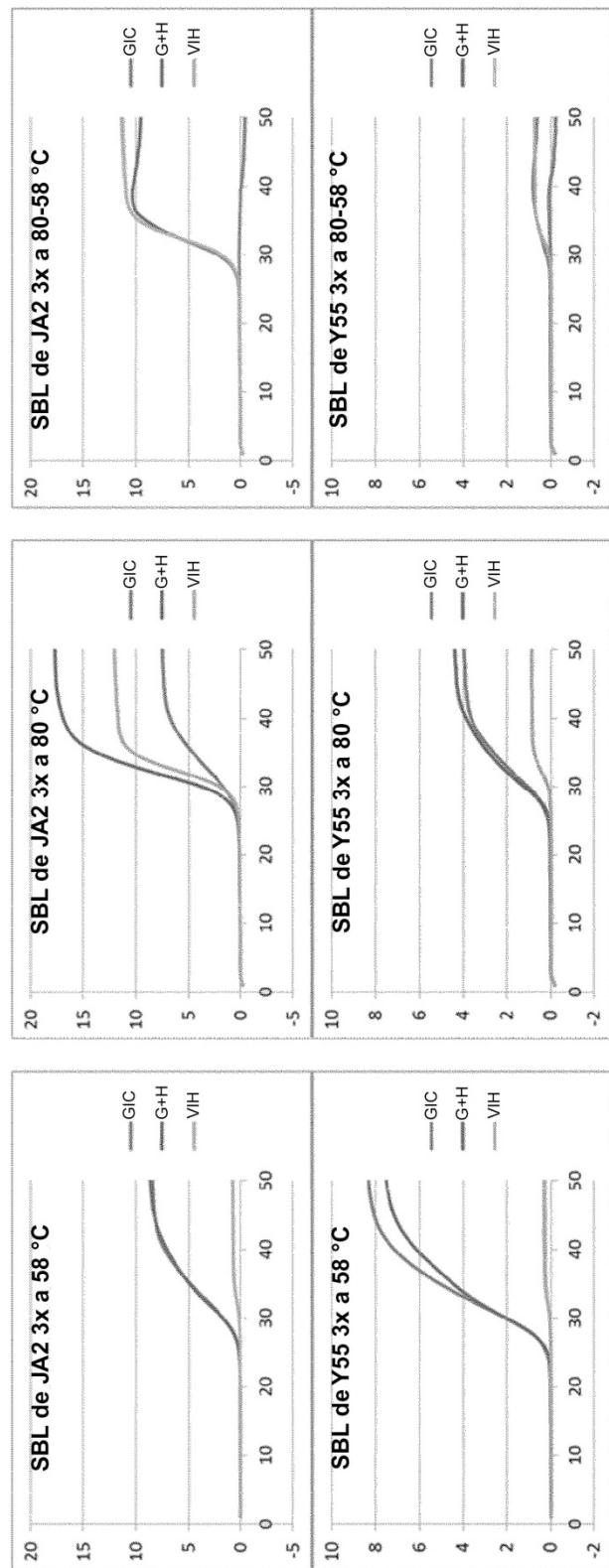
**FIG. 8**



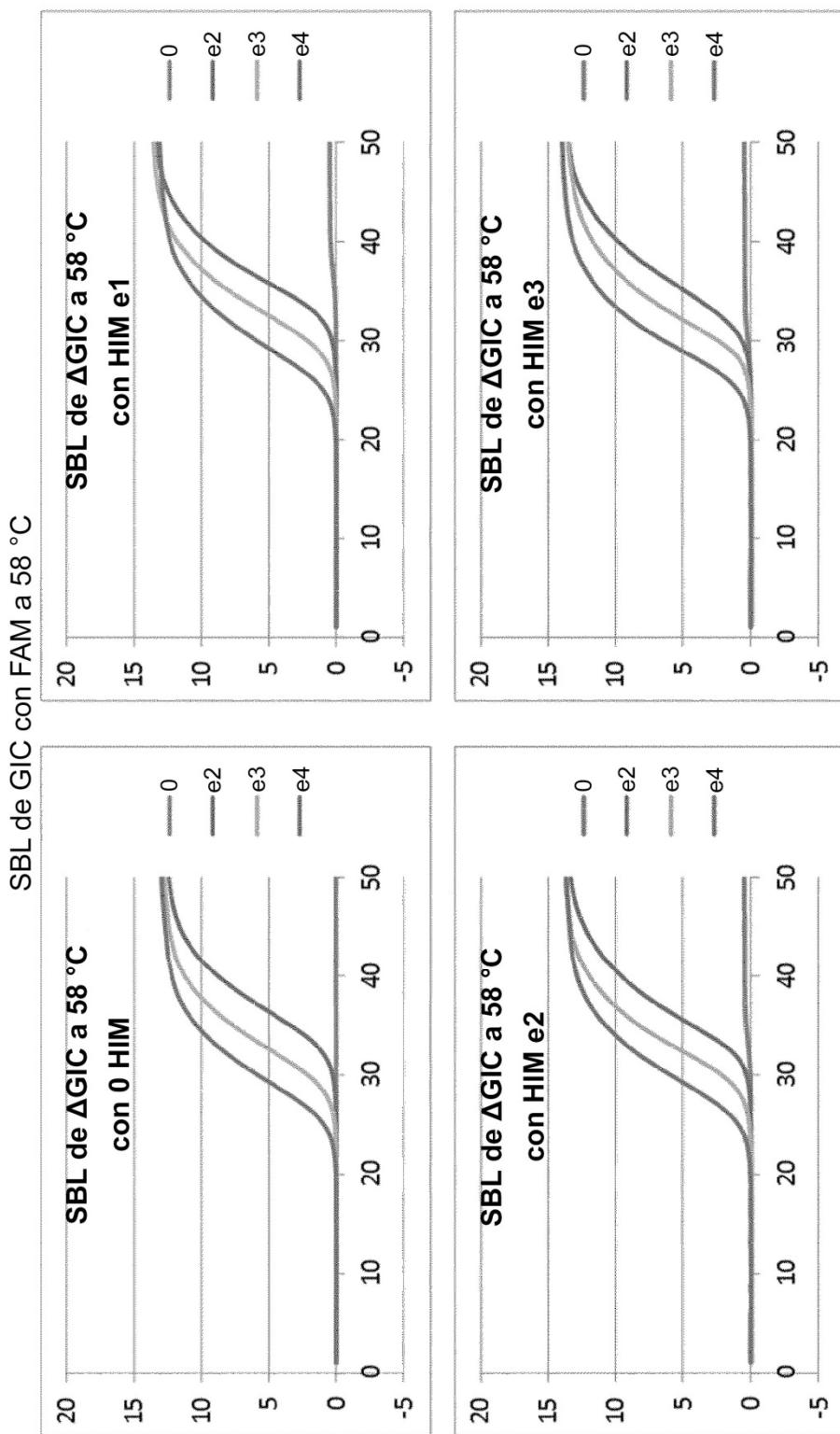
**FIG. 9**

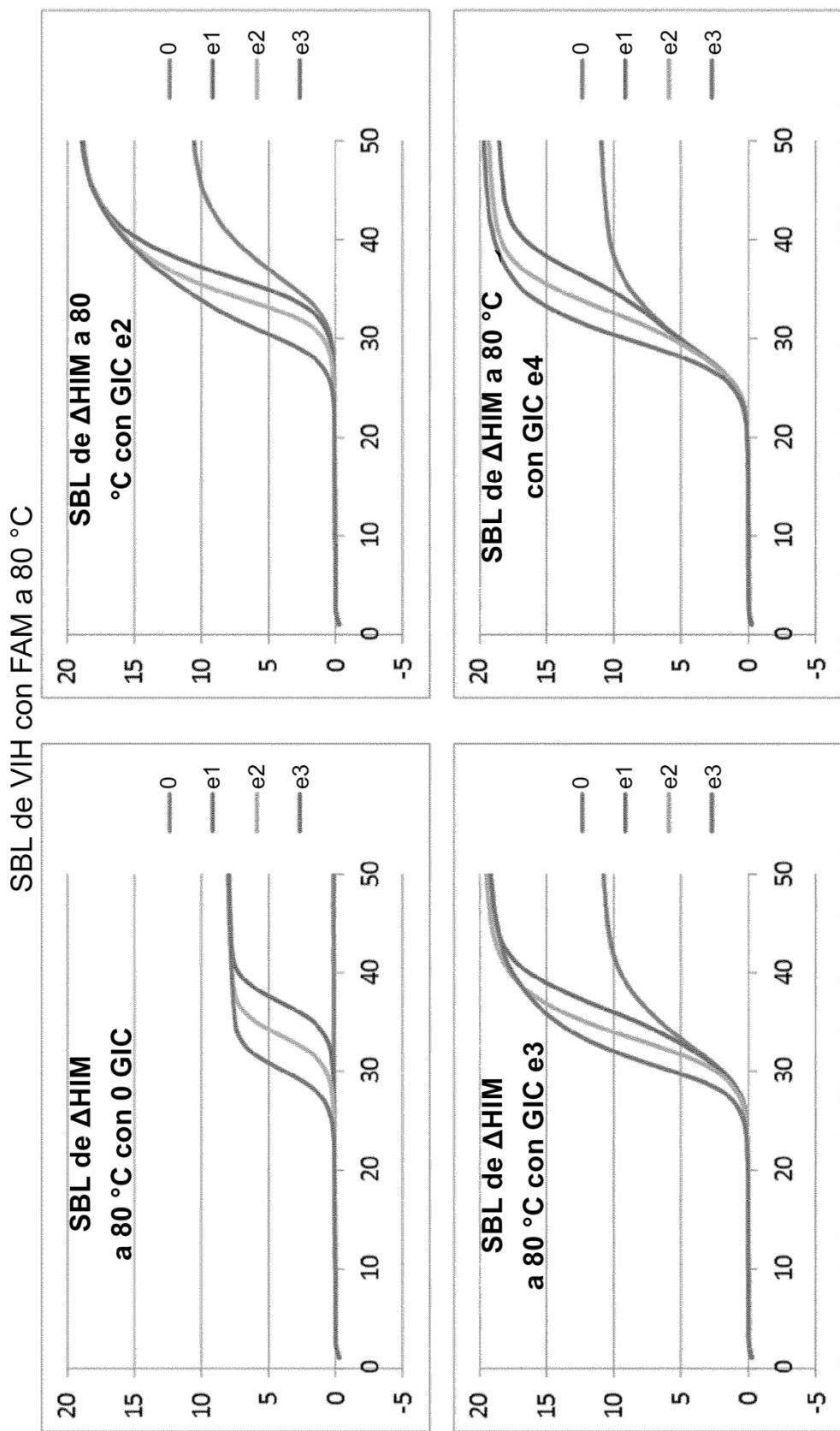


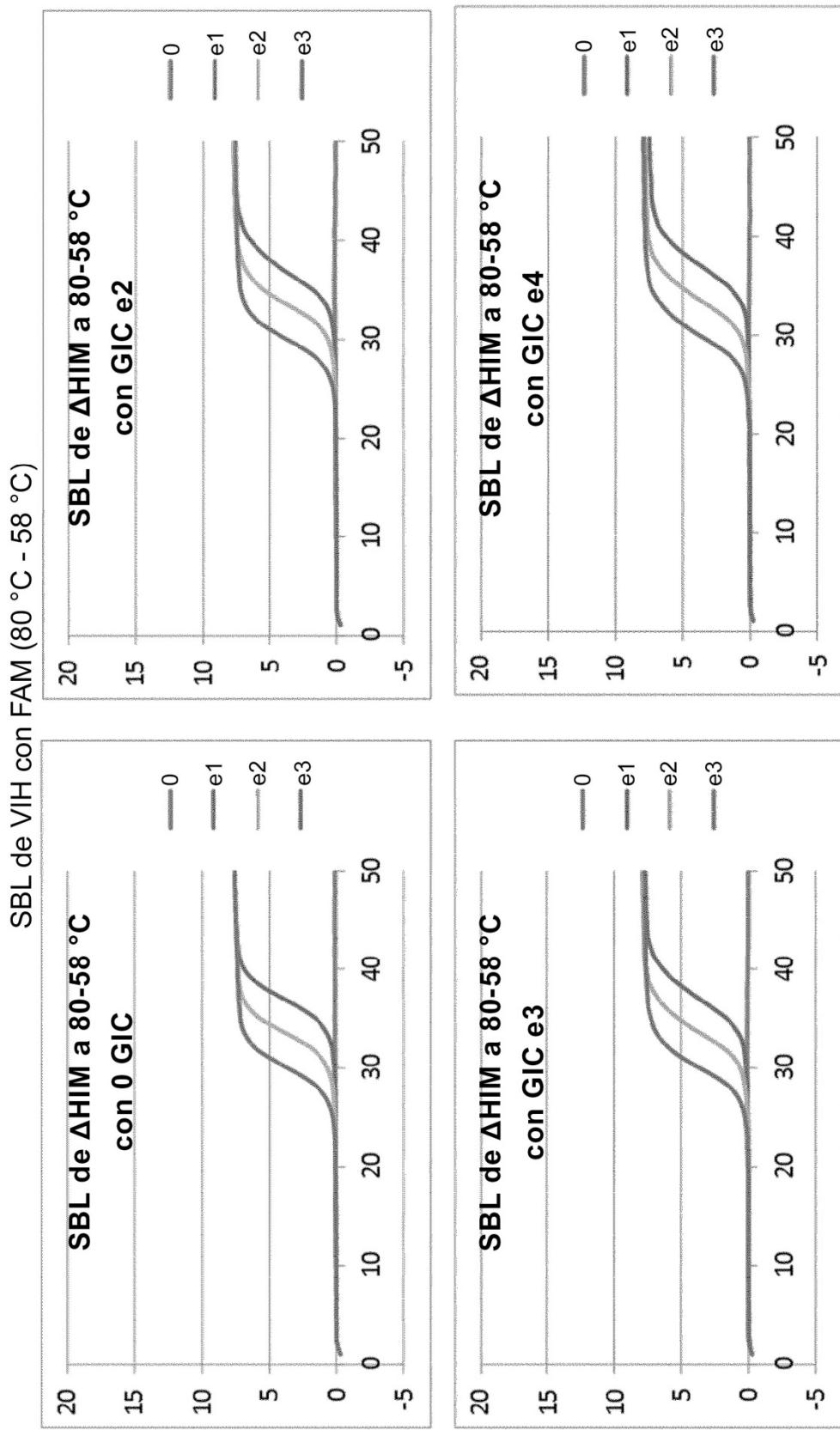
**FIG. 10A**



**FIG. 10B**

**FIG. 11A**

**FIG. 11B**

**FIG. 11C**

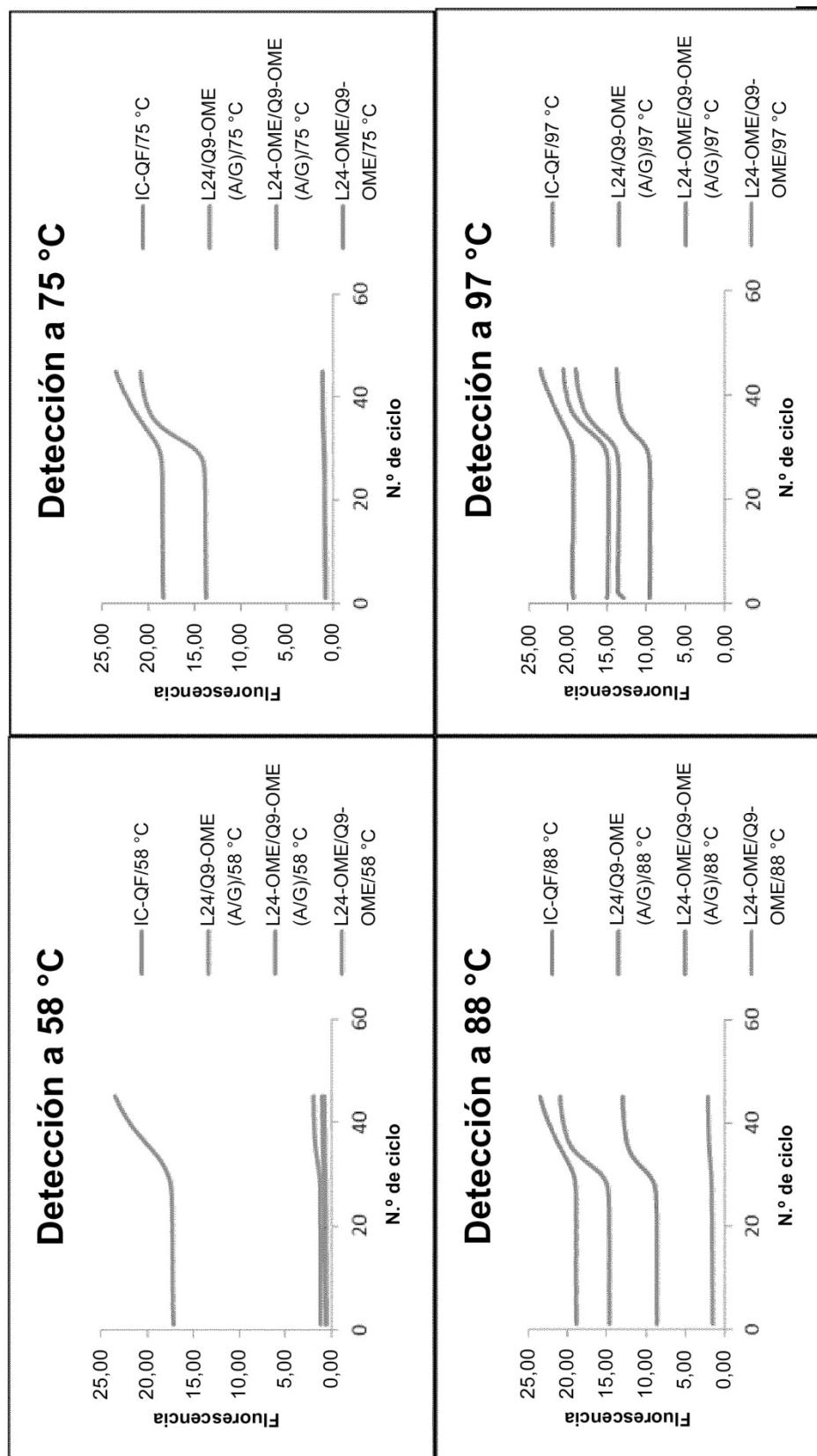


FIG. 12